

OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE, ITS PRODUCTION SYNTHETIC INTERMEDIATE THEREFOR AND USE THEREOF

Publication number: JP7112997

Publication date: 1995-05-02

Inventor: TANIMURA HIROSHI; HAYASE YOJI; NAKA TATSUHIKO; IWASA SUSUMU

Applicant: TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD

Classification:

- international: C07H21/00; A61K31/70; A61K31/7088; A61K48/00; A61P29/00; A61P31/12; A61P35/00; C07H21/04; C07H21/00; A61K31/70; A61K31/7088; A61K48/00; A61P29/00; A61P31/00; A61P35/00; (IPC1-7): C07H21/04; A61K31/70; A61K48/00; C07H21/00

- european:

Application number: JP19940183306 19940804

Priority number(s): JP19940183306 19940804; JP19930196327 19930806

Report a data error here

Abstract of JP7112997

PURPOSE: To obtain the subject novel compound which is useful as an antitumor agent, antiviral agent and antiinflammatory agent, because it is excellent in resistance to hydrolytic enzymes, chemical stability and cell membrane permeability, and inhibits expression of malignant tumor gene, viral gene or the like. **CONSTITUTION:** A compound having the nucleotide sequence of formula I {B<1>, B<2>, B<3> each is nucleic acid residue; X<2>, X<3> are OH, SH, a 1 to 5 C alkyl, 1 to 5 C alkoxy, 1 to 5 C monoalkylamino, (substituted)aromatic ring; W is H, or a protecting group, when at least one of X<2> and X<3> is a (substituted)aromatic ring, and when both of X<2>, X<3> are groups other than (substituted)aromatic ring, W is the group of formula II (Y is a saccharide residue and X<1> is a group of X<2>, the group of formula III; R<1>, R<2>, R<3> each is H, OH, a halogen, 1 to 5C alkoxy (alkyloxy); (n) is 1 to 98}. For example galactose-bonding phosphorothioate oligonucleotide: (GAL)-TsGsGsAsGsCsCsAsTsAsGsCsGsAsGsGsC.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-112997

(43) 公開日 平成7年(1995)5月2日

| | | | | |
|---------------------------|-------|---------|-----|--------|
| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 0 7 H 21/04 | Z | | | |
| A 6 1 K 31/70 | A B E | | | |
| | A D U | 9454-4C | | |
| | A D Y | | | |
| 48/00 | | | | |

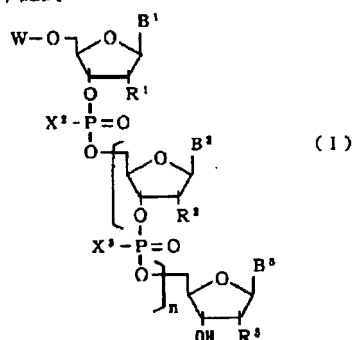
審査請求 未請求 請求項の数26 O L (全114頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------|----------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願平6-183306 | (71) 出願人 | 000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 |
| (22) 出願日 | 平成6年(1994)8月4日 | (72) 発明者 | 谷村 浩 茨城県つくば市竹園2丁目14番地の13 エ ザンス竹園303号 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願平5-196327 | (72) 発明者 | 早瀬 要治 茨城県つくば市松代3丁目12番地の1 武 田松代レジデンス403号 |
| (32) 優先日 | 平5(1993)8月6日 | (72) 発明者 | 仲 建彦 兵庫県神戸市東灘区鴨子ヶ原1丁目4番15 -711号 |
| (33) 優先権主張国 | 日本 (J P) | (74) 代理人 | 弁理士 大多和 明敏 (外1名) 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド誘導体、その製造法、製造中間体および用途

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 下記式



〔式中、Wは水素または保護基、B¹、B²およびB³は核酸残基、X²およびX³はOH基、SH基、C₁₋₈アルキル基、C₁₋₈アルコキシ基、C₁₋₈モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基、R¹、R²およびR³は水素、OH基、ハロゲン原子、C₁₋₈アルコキシ基またはC₁₋₈アルコシアルキルオキシ基、B²、X³およびR²はnの繰り返しにおいて同一または異なっ

いてもよく、nは1~98を示す。〕で表わされるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩、その製造法、製造中間体および用途。

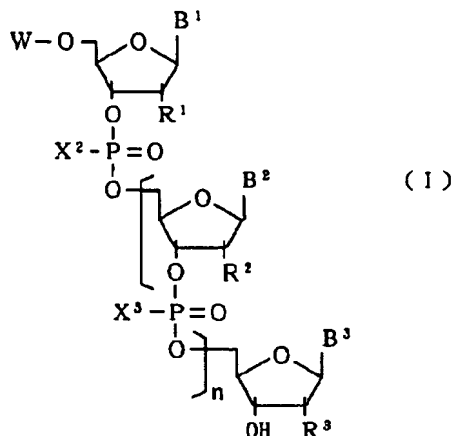
【効果】 上記オリゴヌクレオチド誘導体またはその塩は、生体内において有害なタンパク質を産生する遺伝子のDNAあるいはmRNAに対して優れた相補性があり、特定遺伝子の発現を抑制する薬剤となる。

1

【特許請求の範囲】

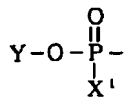
【請求項1】式

【化1】



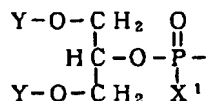
〔式中、Wは水素原子または保護基を示し、B¹、B²およびB³はそれぞれ核酸残基を示し、B²はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、X²およびX³はそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、X³はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、R¹、R²およびR³はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅アルコキシアルキルオキシ基を示し、R²はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、nは1～98の整数を示す。ただし、(1) X²およびX³がそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基であり、X²およびX³の少なくとも1つが置換されていてもよい芳香環基である場合、Wは水素原子または保護基を示し、(2) X²およびX³がそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅モノアルキルアミノ基である場合、Wは式

【化2】



または式

【化3】



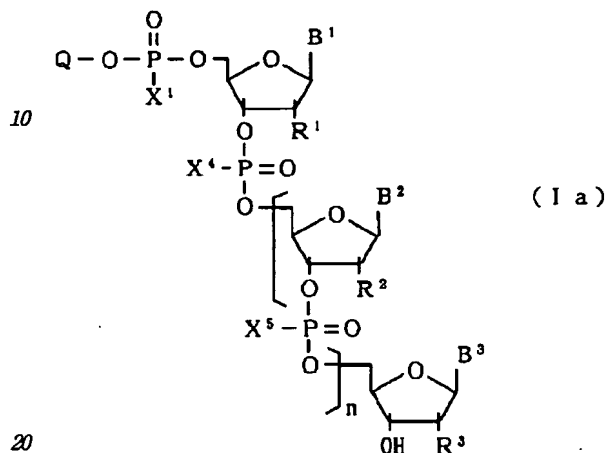
〔式中、Yは糖残基を示し、X¹はOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキ

2

ルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示す。)で表される基を示す。)で表されるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

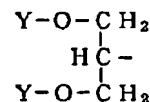
【請求項2】式

【化4】



〔式中、QはYまたは式

【化5】



で表される基を示し、Yは糖残基を示し、X¹はOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、B¹、B²およびB³はそれぞれ核酸残基を示し、B²はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、X⁴およびX⁵はそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基を示し、X⁶はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、R¹、R²およびR³はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅アルコキシアルキルオキシ基を示し、R²はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、nは1～98の整数を示す。)で表されるヌクレオチド配列を有する請求項1記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

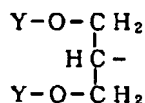
【請求項3】QがYであって、Yで示される糖残基の糖が、①水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基で置換されていてもよいガラクトースまたはマンノース、②水酸基がフェニルカルボニル基で2-アミノ基が置換されていてもよいメリビオース、ゲンチオビオースまたはイソマルトリオース、③n-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシドまたはフェニルグルコシド、④C₁₋₁₀アルキルカルボニル基またはフェニルカルボニル基

3

で置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミンである請求項2記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項4】Qが式

【化6】



であって、Yで示される糖残基の糖が単糖類である請求項2記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項5】B¹、B²およびB³で表される核酸残基が、ヒボキサンチン-9-イル、グアニン-9-イル、アデニン-9-イル、ウラシル-1-イル、チミン-1-イルおよびシトシン-1-イルから成る群から選ばれたものである請求項2～4記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項6】X¹が①OH基、②SH基、③C₁₋₅アルキル基、④C₁₋₅アルコキシ基、⑤C₁₋₅モノアルキルアミノ基、⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれた1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₆₋₁₁アリール基、または⑦C₁₋₆アルキル基、C₂₋₆アルケニル基、C₂₋₆アルキニル基、C₃₋₆シクロアルキル基、C₅₋₇シクロアルケニル基、C₇₋₁₁アラルキル基、C₆₋₁₄アリール基、C₁₋₆アルコキシ基、C₆₋₁₄アリールカルボニル基、C₁₋₆アルキルカルボニル基、C₆₋₁₄アリールカルボニル基、C₁₋₆アルカノイルオキシ基、C₆₋₁₄アリールカルボニルオキシ基、カルボキシ基、C₁₋₆アルコキシカルボニル基、カルバモイル基、N-モノ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、N、N-ジ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、ハロゲン原子、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲノ-C₁₋₄アルキル基、オキソ基、アミジノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-又はジ-C₁₋₄アルキルアミノ基、OH基およびニトロ基から成る群から選ばれた1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれた1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環であり、X⁴およびX⁵がそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅モノアルキルアミノ基である請求項2～5記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項7】R¹、R²およびR³がそれぞれ水素原子、OH基、フルオロ、クロロ、ブロモ、メトキシ基、エトキシ基およびメトキシメチルオキシ基からなる群から選ばれたものである請求項2～6記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

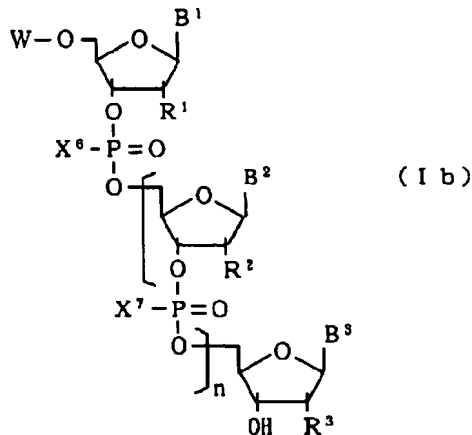
【請求項8】オリゴヌクレオチド誘導体がアンチセンス・オリゴヌクレオチド誘導体である請求項2～7記載の

4

オリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項9】式

【化7】



10

20

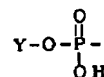
30

40

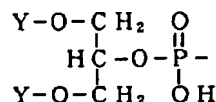
【式中、Wは水素原子または保護基を示し、B¹、B²およびB³はそれぞれ核酸残基を示し、B²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、X⁶およびX⁷はそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、X⁷はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、X⁶およびX⁷の少なくとも1つは置換されていてもよい芳香環基を示し、R¹、R²およびR³はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅アルコキシアルキルオキシ基を示し、R²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、nは1～98の整数を示す。】で表わされるヌクレオチド配列を有する請求項1記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

【請求項10】Wで表される保護基が、(i)式

【化8】



(式中、Yは糖残基を示す。)で表される基、(ii)式【化9】



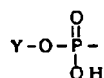
(式中、Yは糖残基を示す。)で表される基、(iii)ハロゲン原子で置換されていてもよいC₁₋₆アルキル基、(iv)ハロゲン原子またはC₁₋₆アルキル基で置換されていてもよいC₆₋₁₁アリール基、(v)ハロゲン原子またはC₁₋₆アルキル基で置換されていてもよいC₇₋₁₂アラルキル基、(vi)ハロゲン原子で置換されていてもよいC₁₋₆アルキルカルボニル基、(vii)フェニル

5

オキシカルボニル基、(viii) C_{1-12} アラルキル-カルボニル基、(ix) ピラニル基、(x) フラニル基、(xi) シリル基、(xii) 1ないし3個のメトキシ基で置換されていてもよいトリチル基または(xiii) メトキシ基で置換されていてもよいフェニルキサンテニル基である請求項9記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

【請求項11】Wが水素原子または式

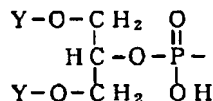
【化10】



であって、Yで示される糖残基の糖が、①水酸基が C_{1-6} アルキルカルボニル基で置換されていてもよいガラクトースまたはマンノース、②水酸基がフェニルカルボニル基で置換されていてもよいメリピオース、ゲンチオピオースまたはイソマルトリオース、③n-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシドまたはフェニルグルコシド、④ C_{1-10} アルキルカルボニル基またはフェニルカルボニル基で置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミンである請求項9記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項12】Wが水素原子または式

【化11】



であって、Yで示される糖残基の糖が単糖類である請求項9記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項13】 B^1 、 B^2 および B^3 で表される核酸残基が、ヒポキサンチン-9-イル、グアニン-9-イル、アデニン-9-イル、ウラシル-1-イル、チミン-1-イルおよびシトシン-1-イルから成る群から選ばれたものである請求項9～12記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項14】 X^6 および X^7 がそれぞれ①OH基、②SH基、③ C_{1-5} アルキル基、④ C_{1-5} アルコキシ基、⑤ C_{1-5} モノアルキルアミノ基、⑥ハロゲン原子、 C_{1-10} アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、 C_{1-10} アルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい C_{6-11} アリール基、または⑦ C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{3-6} シクロアルキル基、 C_{5-7} シクロアルケニル基、 C_{7-11} アラルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{6-14} アリールオキシ基、 C_{1-6} アルキルカルボニル基、 C_{6-14} アリール-カルボニル基、 C_{1-6} アルカノイルオキシ基、 C_{6-14} アリール-カルボニルオキシ基、カルボキシ基、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル

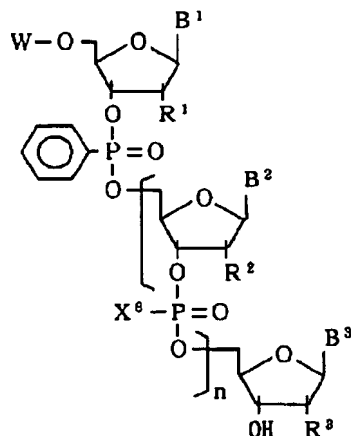
6

基、カルバモイル基、N-モノ- C_{1-4} アルキルカルバモイル基、N,N-ジ- C_{1-4} アルキルカルバモイル基、ハロゲン原子、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲン- C_{1-4} アルキル基、オキソ基、アミノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-又はジ C_{1-4} アルキルアミノ基、OH基およびニトロ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環である請求項9～13記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項15】 R^1 、 R^2 および R^3 がそれぞれ水素原子、OH基、フルオロ、クロロ、プロモ、メトキシ基、エトキシ基およびメトキシメチルオキシ基からなる群から選ばれたものである請求項9～14記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項16】式

【化12】



【式中、Wは水素原子または保護基を示し、 B^1 、 B^2 および B^3 はそれぞれ核酸残基を示し、 B^2 はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、 X^6 はOH基、SH基、 C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基、 C_{1-5} モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、 C_{1-5} アルコキシ基または C_{1-5} アルコキシアルキルオキシ基を示し、 R^2 はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、nは1～98の整数を示す。】で表わされるヌクレオチド配列を有する請求項9記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

【請求項17】式

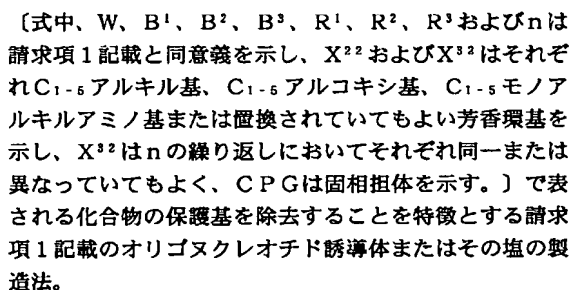
【化13】



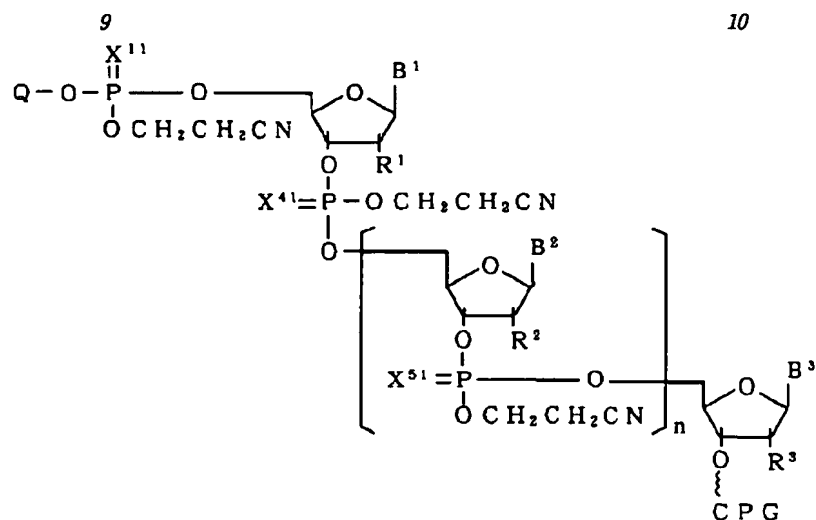
30

【請求項19】式

【化 1 6】

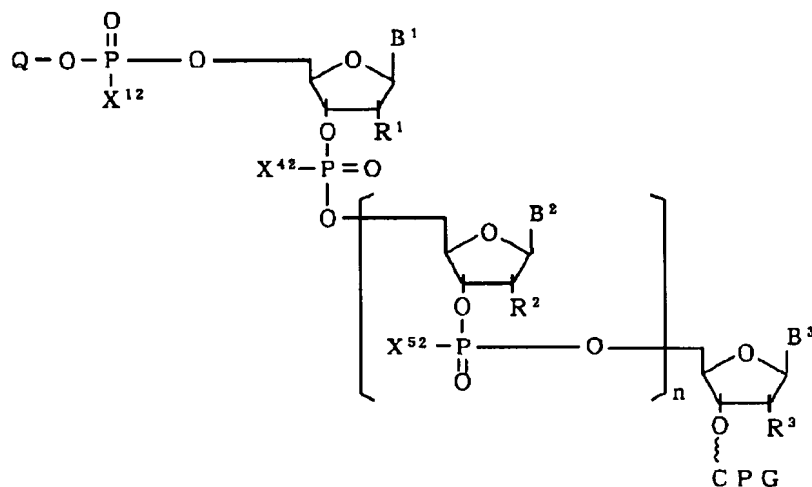


【化 1 6】



〔式中、Q、 B^1 、 B^2 、 B^3 、 R^1 、 R^2 、 R^3 およびnは請求項2記載と同意義を示し、 X^{11} 、 X^{41} および X^{51} はそれぞれOまたはSを示し、 X^{51} はnの繰返しにおい

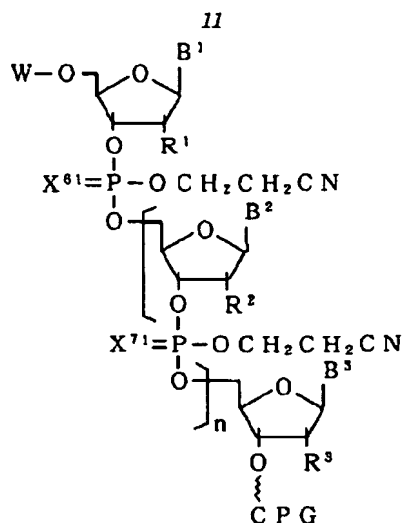
てそれぞれ同一または異なってもよく、CPGは固相担体を示す。〕で表される化合物、または式【化17】



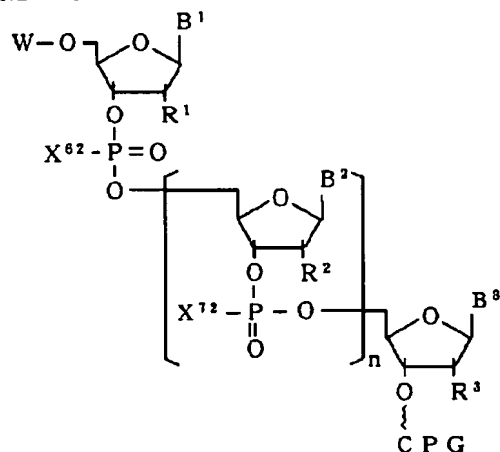
〔式中、Q、 B^1 、 B^2 、 B^3 、 R^1 、 R^2 、 R^3 およびnは請求項2記載と同意義を示し、 X^{12} 、 X^{42} および X^{52} はそれぞれ C_{1-8} アルキル基、 C_{1-8} アルコキシ基、 C_{1-8} モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、 X^{52} はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、CPGは固相担体を示す。〕で表される化合物の保護基を除去することを特徴とする請求項2記載のオリゴヌクレオチド誘導体の製造法。

【請求項20】式

【化18】



〔式中、W、B¹、B²、B³、R¹、R²、R³およびnは請求項9記載と同意義を示し、X⁶¹およびX⁷¹はそれぞれOまたはSを示し、X⁷¹はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、CPGは固相担体を示す。〕で表される化合物、または式
【化19】

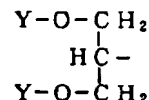


〔式中、W、B¹、B²、B³、R¹、R²、R³およびnは請求項9記載と同意義を示し、X⁶²およびX⁷²はそれぞれC₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、X⁷²はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、CPGは固相担体を示す。〕で表される化合物の保護基を除去することを特徴とする請求項9記載のオリゴヌクレオチド誘導体の製造法。

〔請求項21〕請求項1～17記載のいずれかのオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩を含有することを特徴とする遺伝子発現抑制剤。

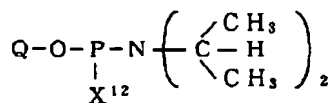
〔請求項22〕請求項1～17記載のいずれかのオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩を含有することを特徴

10 〔式中、QはYまたは式
【化21】

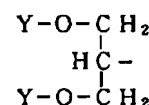


で表される基を示し、Yは糖残基を示す。〕で表される糖誘導体。

〔請求項24〕式、
【化22】

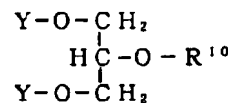


〔式中、QはYまたは式
【化23】



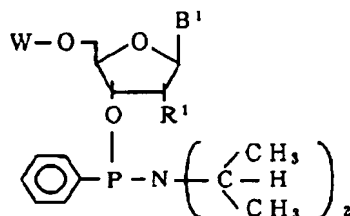
30 〔式中、Yは糖残基を示し、X¹²はC₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示す。〕で表される糖誘導体。

〔請求項25〕式
【化24】



40 〔式中、Yは糖残基を示し、R¹⁰は水素原子またはベンジル基を示す。〕で表される糖誘導体。

〔請求項26〕式
【化25】



〔式中、Wは水素原子または保護基を示し、B¹は核酸残基を示し、R¹は水素原子、OH基、ハロゲン原子、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅アルコシアルキルオキシ基を示す。〕で表されるヌクレオチド誘導体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、①悪性腫瘍細胞中の悪性腫瘍遺伝子の発現を阻害する、②ウイルスに由来しているウイルス遺伝子の発現を抑制する、③炎症を引き起こす原因となるタンパク質を産生する遺伝子の発現を抑制する、あるいは④悪性腫瘍の化学療法の際に問題となる薬剤耐性遺伝子の発現を制御する等により化学療法の効果を確実なものにするオリゴヌクレオチド誘導体または⑤PTCA (Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty; 経皮的冠動脈内腔拡張術) 後の血管再狭窄に関わる細胞増殖因子の産生を阻害するオリゴヌクレオチド誘導体、該オリゴヌクレオチド誘導体の製造法および該オリゴヌクレオチド誘導体を含有する悪性腫瘍、ウイルス疾患または炎症を引き起こす原因となる遺伝子などの特定遺伝子の発現を抑制する薬剤、該オリゴヌクレオチド誘導体を用いる種々の化合物のスクリーニング法などに関する。

【0002】

【従来の技術】特定遺伝子の発現の結果、その遺伝子産物が原因となって生じる疾病は数多く知られており、その例として以下のようなものがある。オンコジーンによって発生する病原性を持つウイルス遺伝子あるいは腫瘍遺伝子は、細胞内に内在しているもの(例えばプロトオンコジーンのオンコジーンへの変換)と、外来性と呼ばれる細胞外からのウイルスに感染した結果によるものと2種類に大別されており、これらの遺伝子の発現が、ウイルス病の発症または正常細胞の異常増殖を引き起こされるひとつの要因となっていることが明らかにされてきている。また、ICAM-1などの遺伝子が発現することにより、産生されてくる接着タンパク質が炎症を引き起こす原因となっている。さらに、直接的にはそれらの遺伝子の発現が病因になっているわけではないが、悪性腫瘍の化学療法の際に必ず問題となる抗腫瘍剤に対して生体が薬剤耐性を獲得してしまい、その結果完全治癒を困難にしているということなどは、薬剤耐性遺伝子の発現が間接的な原因であると考えられることもできる。したがって、このような疾病を引き起こす原因となる遺伝子の活性化または発現を制御する薬剤は抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、抗炎症剤などとして有効なものになると期待される。このような背景のもと、遺伝子の発現制御を、その遺伝子に特有な領域中の配列またはその遺伝子から転写されるmRNAに対して相補的な配列を持つオリゴヌクレオチド誘導体でおこなう技術、すなわちアンチセンス法が広く知られている(G. Zon, *Pharmaceutical Research*, vol. 5, No. 9, 539 (1988). C. A. Stein et al., *Cancer Res.*, vol. 48, 2659 (1988). E. Uhlman et al., *Chemical Reviews*, vol. 90, No. 4, 543 (1990). J. Goodchild, *Bioconjugate Chem.*, vol. 1, No. 3, 165 (1990).)。特に、ウイルス遺伝子、腫瘍遺伝子などの発現制御を、これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いておこなおうとする試みは詳しく研究されてきた。この時に用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、天然型のままではヌクレアーゼなどの加水分解酵素で簡単に分解されてしまう。そのためこれらの分解酵素に対して安定性を増すために、さまざまな化学修飾を施したヌクレオチド誘導体が開発されてきた。例えばヌクレオチドのリン酸基を修飾したものとしては、ホスホロチオエート(F. Eckstein, *Angew. Chem.*, vol. 6, 431, (1983). F. Eckstein et al., *Biochemistry*, vol. 23, 3443 (1984). J. W. Stec et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 106, 6077 (1984). F. Eckstein et al., *Annu Rev. Biochem.*, vol. 54, 367, (1985).)、メチルホスホネート(P. S. Millar et al., *Biochemistry*, vol. 18, 5134 (1979). P. S. Millar et al., *Biochimie*, vol. 67, 769 (1985). P. O. P. Ts'0 et al., *Ann N.Y. Acad Sci.*, vol. 507 220 (1988).)、ホスホロジチオエート(M. H. Caruthers et al., *Tetrahedron Lett.*, vol. 29, 2911, (1988). M. H. Caruthers et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, 2321, (1989).)などがある。あるいは、ヌクレオチドの構成単位であるリボース環の2'-位を修飾することにより安定性を高める試みのひとつとして、2'-糖水酸基をメチル化する(Y. Furukawa et al., *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 13, 1273 (1965). E. Ohtsuka et al., *Nucleic Acids Res.*, vol. 15, 6131 (1987).)といったことなどがおこなわれてきた。さらに、こうした修飾ヌクレオチドに対して細胞膜透過性を高める目的で、末端にコレステロール(R. L. Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, 6553 (1989).)やポリ(L-リジン)(M. Lemaitre et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, 648 (1987).)を付加するといった誘導体なども合成されてきた。またリボソームで包括することにより細胞内にアンチセンス分子を導入しようとする試みもなされてきた(P. L. Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, 7143 (1987).)。これらさまざまな誘導体の中で、例えばメチルホスホネートは、加水分解酵素に対して、そして化学的安定性も高まることが期待でき、さらに中性分子となるため膜透過性の向上も期待できるが、水溶液に対しての溶解性が極端に悪くなるといった欠点を持っている。またホスホロジチオエートはリン酸基のキラリティーが消失するが、リン酸基に2個の硫黄原子が存在するので天然型に比べてかなりのひずみがかかり、そのためアンチセンスとしての二重鎖形成能が落ちてしまう。また合成する上で他の誘導体に比較して困難であるため大量合成をおこなうには問題がある。ポリ

mer Res., vol. 48, 2659 (1988). E. Uhlman et al., *Chemical Reviews*, vol. 90, No. 4, 543 (1990). J. Goodchild, *Bioconjugate Chem.*, vol. 1, No. 3, 165 (1990).)。特に、ウイルス遺伝子、腫瘍遺伝子などの発現制御を、これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いておこなおうとする試みは詳しく研究されてきた。この時に用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、天然型のままではヌクレアーゼなどの加水分解酵素で簡単に分解されてしまう。そのためこれらの分解酵素に対して安定性を増すために、さまざまな化学修飾を施したヌクレオチド誘導体が開発されてきた。例えばヌクレオチドのリン酸基を修飾したものとしては、ホスホロチオエート(F. Eckstein, *Angew. Chem.*, vol. 6, 431, (1983). F. Eckstein et al., *Biochemistry*, vol. 23, 3443 (1984). J. W. Stec et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 106, 6077 (1984). F. Eckstein et al., *Annu Rev. Biochem.*, vol. 54, 367, (1985).)、メチルホスホネート(P. S. Millar et al., *Biochemistry*, vol. 18, 5134 (1979). P. S. Millar et al., *Biochimie*, vol. 67, 769 (1985). P. O. P. Ts'0 et al., *Ann N.Y. Acad Sci.*, vol. 507 220 (1988).)、ホスホロジチオエート(M. H. Caruthers et al., *Tetrahedron Lett.*, vol. 29, 2911, (1988). M. H. Caruthers et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, 2321, (1989).)などがある。あるいは、ヌクレオチドの構成単位であるリボース環の2'-位を修飾することにより安定性を高める試みのひとつとして、2'-糖水酸基をメチル化する(Y. Furukawa et al., *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 13, 1273 (1965). E. Ohtsuka et al., *Nucleic Acids Res.*, vol. 15, 6131 (1987).)といったことなどがおこなわれてきた。さらに、こうした修飾ヌクレオチドに対して細胞膜透過性を高める目的で、末端にコレステロール(R. L. Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, 6553 (1989).)やポリ(L-リジン)(M. Lemaitre et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, 648 (1987).)を付加するといった誘導体なども合成されてきた。またリボソームで包括することにより細胞内にアンチセンス分子を導入しようとする試みもなされてきた(P. L. Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, 7143 (1987).)。これらさまざまな誘導体の中で、例えばメチルホスホネートは、加水分解酵素に対して、そして化学的安定性も高まることが期待でき、さらに中性分子となるため膜透過性の向上も期待できるが、水溶液に対しての溶解性が極端に悪くなるといった欠点を持っている。またホスホロジチオエートはリン酸基のキラリティーが消失するが、リン酸基に2個の硫黄原子が存在するので天然型に比べてかなりのひずみがかかり、そのためアンチセンスとしての二重鎖形成能が落ちてしまう。また合成する上で他の誘導体に比較して困難であるため大量合成をおこなうには問題がある。ポリ

(L-リジン)などを導入する試みについては、かなり強い細胞毒性が生じてしまうため(J. P. Leonetti et al., Gene, vol. 72, 323 (1988).)、アンチセンスに対する実用的な修飾反応にはなっていない。こうした中で、アンチセンス効果を発揮し、加水分解酵素に対して安定性を示し、また細胞毒性も低いという点を重視して、現時点ではホスホロチオエートが最も優れたアンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いられている。しかしながら、このホスホロチオエートはリン酸基にキラリティーが生じるため二重鎖形成能はどうしても低下してしまい、また合成する段階で目的の硫黄化合物と、微量含まれてくる酸化物の単離精製をおこなわなければならないといった問題点がある。さらにホスホロチオエートの細胞膜透過性、および核移行性の低さも問題にされるようになり、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤などとして開発していく時の薬効およびその持続性に問題が生じると考えられている。

【0003】

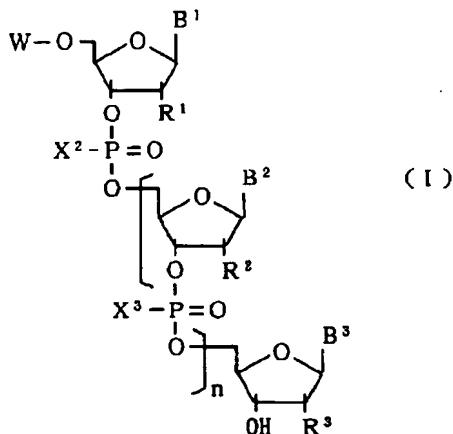
【発明が解決しようとする課題】本発明は、加水分解酵素に対する抵抗性を示し、化学的にも安定な構造を持ち、さらに、優れた細胞膜透過性を有することによってアンチセンス効果を最大限に発揮することができ、上記のような問題点のない新規オリゴヌクレオチド誘導体、その製造法、該オリゴヌクレオチド誘導体の製造中間体としても有用なリン酸化糖誘導体、分岐糖誘導体並びにヌクレオチド誘導体および該オリゴヌクレオチド誘導体を含む抗腫瘍剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤等を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、式

【0005】

【化26】

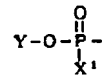


【0006】(式中、Wは水素原子または保護基を示し、B¹、B²およびB³はそれぞれ核酸残基を示し、B²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってい

てもよく、X²およびX³はそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、X³はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、R¹、R²およびR³はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅アルコシアルキルオキシ基を示し、R²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、nは1~98の整数を示す。ただし、(1) X²およびX³がそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基であり、X²およびX³の少なくとも1つが置換されていてもよい芳香環基である場合、Wは水素原子または保護基を示し、(2) X²およびX³がそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅モノアルキルアミノ基である場合、Wは式

【0007】

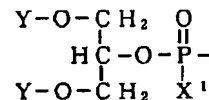
【化27】



【0008】または式

【0009】

【化28】

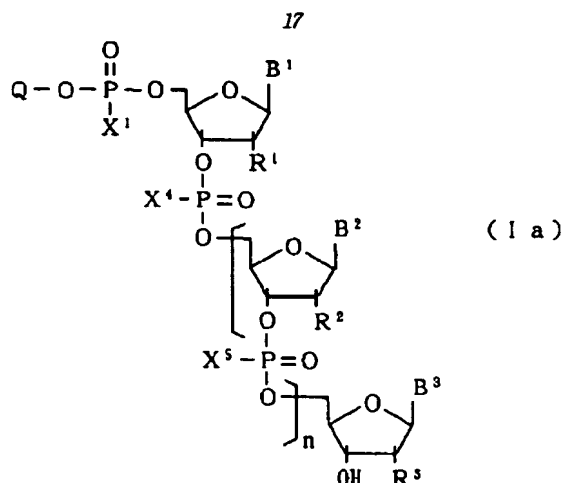


【0010】(式中、Yは糖残基を示し、X¹はOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示す。)で表される基を示す。)で表わされるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド誘導体(I)またはその塩を合成することに成功した。

【0011】より具体的には、式

【0012】

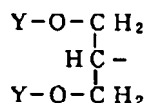
【化29】



【0013】〔式中、QはYまたは式

【0014】

【化30】

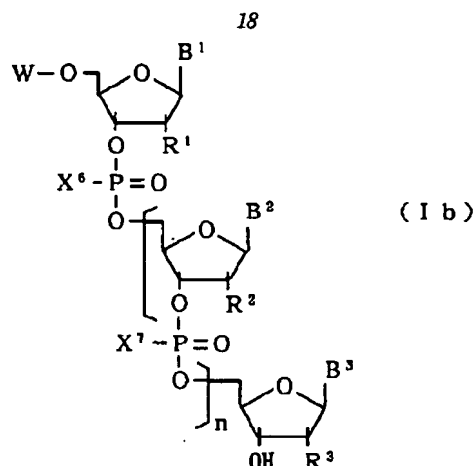


【0015】で表される基を示し、Yは糖残基を示し、X¹はOH基、SH基、C₁-₆アルキル基、C₁-₆アルコキシ基、C₁-₆モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、B¹、B²およびB³はそれぞれ核酸残基を示し、B²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、X⁴およびX⁵はそれぞれOH基、SH基、C₁-₆アルキル基、C₁-₆アルコキシ基、C₁-₆モノアルキルアミノ基を示し、X⁶はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、R¹、R²およびR³はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、C₁-₆アルコキシ基またはC₁-₆アルコキシアルキルオキシ基を示し、R²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、nは1~98の整数を示す。〕で表わされるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド誘導体 (I a) またはその塩、および式

【0016】

【化31】

10



【0017】〔式中、Wは水素原子または保護基を示し、B¹、B²およびB³はそれぞれ核酸残基を示し、B²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、X⁶およびX⁷はそれぞれOH基、SH基、C₁-₆アルキル基、C₁-₆アルコキシ基、C₁-₆モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、X⁷はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、X⁶およびX⁷の少なくとも1つは置換されていてもよい芳香環基を示し、R¹、R²およびR³はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、C₁-₆アルコキシ基またはC₁-₆アルコキシアルキルオキシ基を示し、R²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、nは1~98の整数を示す。〕で表わされるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド誘導体 (I b) またはその塩を合成することに成功した。

【0018】そして、本発明者らは、オリゴヌクレオチド誘導体 (I a) において、2'-糖酸基をハロゲン原子に置換し、あるいはアルキル化、アルコキシアルキル化することにより、該オリゴヌクレオチド誘導体が予想外にも加水分解酵素に対する抵抗性を示すとともに、化学的にも安定化することを見出した。また、該オリゴヌクレオチド誘導体のリボース環が3'-エンドコンフォメーションを取り得るために、標的DNA、RNAに対してより強い相補鎖形成能を有することを見出した。さらに、アンチセンス分子の5'-末端にリン酸基を介してさまざまな糖誘導体を導入することにより、

(1) 糖レセプターの特性であるクラスター効果を考慮して化学合成した分岐オリゴ糖を用いることにより、生体内に存在するグルコースレセプター、ガラクトースレセプター、マンノースレセプターなどの糖誘導体を認識するレセプターを利用して、アンチセンス分子を細胞内に導入することができ、(2) 糖誘導体の水酸基に疎水性が上がる置換基を導入することにより、アンチセンスヌクレオチドと細胞膜との親和性を高めることができ、

(3) メチルホスホネートなどの中性なアンチセンスに

19

対してはポリヒドロキシル体としての糖誘導体が水溶液に対する溶解性を高める効果をもたらし、その結果これらアンチセンス分子の有効性を高めることができるといった数多くの利点を見出した。

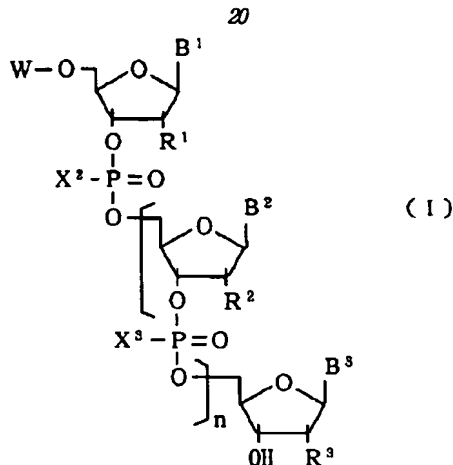
〔0019〕一方、オリゴヌクレオチド誘導体（I b）は、分子中にフェニルホスホネートタイプのヌクレオチドを少なくとも1つ（好ましくは、5'末端に）、好ましくは2つ（好ましくは、5'末端および3'末端に）含有することを特徴とする。本発明者らは、このタイプのオリゴヌクレオチドが、5'-末端にリン酸基を介した糖誘導体を有するか否かに拘わらず、優れた遺伝子発現抑制活性を有することを見いだした。すなわち、リン酸基にフェニル基を導入しホスホネート結合としたことにより、（1）このオリゴヌクレオチドの核酸分解酵素に対する抵抗性が增大することが期待され、（2）またアンチセンス分子の脂溶性が上昇するため細胞膜との親和性が高まり、その結果この分子の膜透過性が向上することが期待でき、（3）さらにフェニル基の存在により各塩基間のスタッキング効果が増強され、オリゴマーとしての高次構造が安定化される可能性がある等の多くの利点を見いだした。さらに、本発明者らは、上記オリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩の有用な製造中間体となる新規な糖誘導体ならびにヌクレオチド誘導体を合成することに成功した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、新規なオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩、その製造法、該オリゴヌクレオチド誘導体の製造中間体として有用な糖誘導体ならびにヌクレオチド誘導体、および該オリゴヌクレオチド誘導体を含有する抗腫瘍剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤等に関する。より具体的には、本発明は、下記の〔A〕オリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩、その製造法および用途、〔B〕オリゴヌクレオチド誘導体（I a）またはその塩、その製造法および用途、〔C〕オリゴヌクレオチド誘導体（I b）またはその塩、その製造法および用途、〔D-1〕糖誘導体（A）、〔D-2〕糖誘導体（B）、〔D-3〕糖誘導体（C）、および〔E〕ヌクレオチド誘導体を提供する。

【0020】〔A〕下記の第（１）項～第（８）項に示すオリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩、その製造法および用途

(1) 式

【0 0 2 1】

【化 3 2】



【0022】〔式中、Wは水素原子または保護基を示し、 B^1 、 B^2 および B^3 はそれぞれ核酸残基を示し、 B^2 はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なっているいてもよく、 X^2 および X^3 はそれぞれOH基、SH基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{1-6} モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、 X^3 はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なっているいてもよく、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、 C_{1-6} アルコキシ基または C_{1-6} アルコキシアルキルオキシ基を示し、 R^2 はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なっているいてもよく、nは1～98の整数を示す。

【0023】ただし、(i) X^2 および X^3 がそれぞれ OH 基、SH 基、 C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基、 C_{1-5} モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基であり、 X^2 および X^3 の少なくとも 1 つが置換されていてもよい芳香環基である場合、W は水素原子または保護基を示し (ii) X^2 および X^3 がそれぞれ OH 基、SH 基、 C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基または C_{1-5} モノアルキルアミノ基である場合、W は式

【0024】

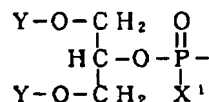
【化 3 3】



【0025】または式

【0026】

【化 3 4】



【0027】（式中、Yは糖残基を示し、X'はOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示す。）で表される基を示す。）で表わされ

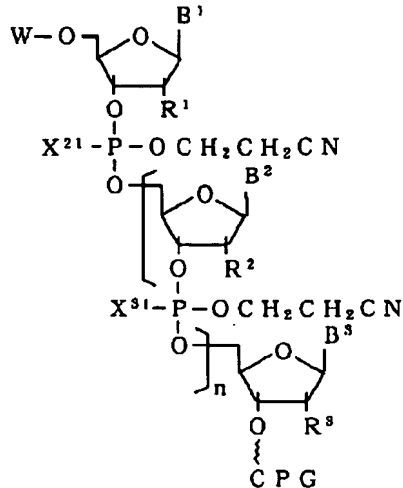
21

るヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

【0028】(2)式

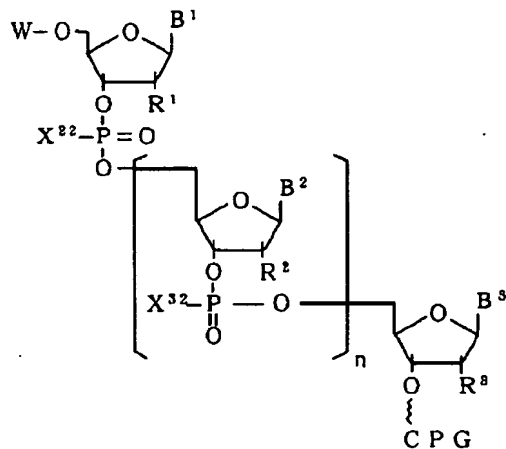
【0029】

【化35】



【0030】〔式中、W、B¹、B²、B³、R¹、R²、R³およびnは請求項1記載と同意義を示し、X²¹およびX³¹はそれぞれOまたはSを示し、X³¹はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、CPGは固相担体を示す。〕で表される化合物、または式【0031】

【化36】



【0032】〔式中、W、B¹、B²、B³、R¹、R²、R³およびnは請求項1記載と同意義を示し、X²²およびX³²はそれぞれC₁₋₆アルキル基、C₁₋₆アルコキシ基、C₁₋₆モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、X³²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、CPGは固相担体を示す。〕で表される化合物の保護基を除去すること

22

を特徴とする第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体(I)またはその塩の製造法。

(3)第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体(I)またはその塩を含有することを特徴とする遺伝子発現抑制剤。

(4)悪性腫瘍、ウイルス疾患または炎症を引き起こす原因となる遺伝子の発現抑制剤である第(3)項記載の遺伝子発現抑制剤。

(5)遺伝子発現抑制が、(i)DNAからプレmRNAへの転写の抑制、(ii)プレmRNAから成熟mRNAへのスプライシングの抑制または(iii)成熟mRNAからタンパク質への翻訳の抑制である第(3)項または第(4)項記載の遺伝子発現抑制剤。

(6)悪性腫瘍を引き起こす原因となる遺伝子がsrc、fps、yes、ros、myb、myc、erb、rel、mos、abl、ras、fos、fes、fms、sis、raf、neuおよびp53から成る群から選ばれる遺伝子であり、ウイルス疾患を引き起こす原因となる遺伝子がエイズウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、パピローマウイルス、ポリオウイルス、ピコルナウイルスおよびアデノウイルスから成る群から選ばれる遺伝子であり、炎症を引き起こす原因となる遺伝子がICAM-1、ELAM-1およびVLA-1から成る群から選ばれる遺伝子である第(4)項記載の遺伝子発現抑制剤。

【0033】(7)遺伝子がICAM-1遺伝子である第(3)項記載の遺伝子発現抑制剤。

(8)第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体(I)またはその塩を含有することを特徴とするPTCA後の血管再狭窄抑制剤。

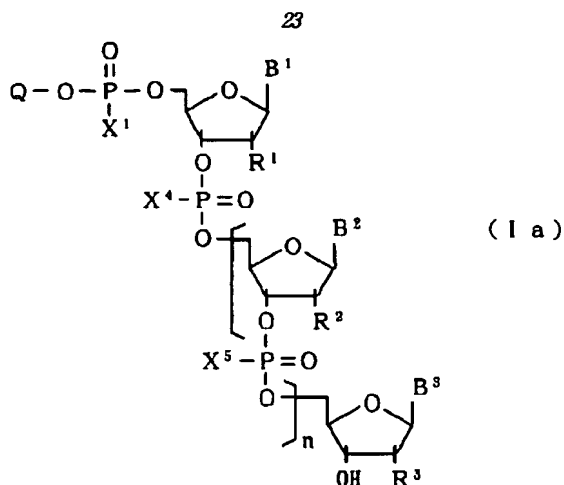
【0034】〔B〕下記の第(1)項～第(47)項に示すオリゴヌクレオチド誘導体(Ia)またはその塩、その製造法および用途

(1)糖残基と結合したリン酸基が5'-末端の水酸基においてリン酸ジエステル結合したオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

【0035】(2)式

【0036】

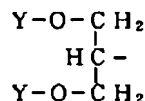
【化37】



【0037】〔式中、QはYまたは式

【0038】

【化38】



【0039】で表される基を示し、Yは糖残基を示し、X¹はOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、B¹、B²およびB³はそれぞれ核酸残基を示し、B²はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、X⁴およびX⁵はそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基を示し、X⁵はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、R¹、R²およびR³はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅アルコキシアルキルオキシ基を示し、R²はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、nは1~98の整数を示す。〕で表わされるヌクレオチド配列を有する第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

【0040】(3) Yで示される糖残基の糖が、①置換されていてもよい単糖類、②置換されていてもよいオリゴ糖および③前記の単糖類または前記のオリゴ糖のグリコシド誘導体からなる群より選ばれたものである第(2)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【0041】(4) Yで示される糖残基の糖が、(i) 水酸基(好ましくはヘミアセタール性水酸基以外の水酸基)が①ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいアシル基、②ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニ

トロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいアルキル基および③置換されていてもよいアミノ基から成る群から選ばれる1ないし4個程度の置換基で置換されていてもよい単糖類、(ii) 水酸基(好ましくはヘミアセタール性水酸基以外の水酸基)が①ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいアシル基、②ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいアルキル基および③置換されていてもよいアミノ基から成る群から選ばれる1ないし4個程度の置換基で置換されていてもよいオリゴ糖または(iii) 上記の単糖類またはオリゴ糖の水酸基が非糖成分である-O-R⁷、-S-R⁸または-N-R⁹(式中、R⁷、R⁸およびR⁹はそれぞれ置換されていてもよい炭化水素基を示す。)で置換されたグリコシド誘導体である第(2)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(5) アシル基がC₁₋₁₀アルキルカルボニル基、フェニルカルボニル基またはベンジルカルボニル基である第(4)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(6) アルキル基がC₁₋₂₀アルキル基である第(4)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(7) アミノ基が式-NR⁴R⁵(式中、R⁴およびR⁵は、それぞれ(i) 水素原子、(ii) ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいアシル基または(iii) ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいアルキル基を示す。)で表されるアミノ基である第(4)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(8) 単糖類が5炭糖アルドース、5炭糖ケトース、6炭糖アルドースまたは6炭糖ケトースである第(3)または第(4)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(9) 5炭糖アルドースがリボース、アラビノース、キシロースまたはリキソースであり、5炭糖ケトースがリブロースまたはキシロースであり、6炭糖アルドースがアロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グルース、イドース、ガラクトースまたはタロースであり、6炭糖ケトースがブシコース、フルクトース、ソルボースまたはタガトースである第(8)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(10) オリゴ糖がラクトース、 α 、 α -トレハロース、N-アセチルノイラミニルラクトース、ジフコシルラクトース、フコシルラクトース、ラクツロース、ゲンチアノース、イソリクノース類、リクノース類、プランテオース、スクロース、ピフルコース、1, 6-ジグルコシルマンニトール、ガラクトシルスクロース 6- β -グルコシルマンニトール、ラミナリビオース、イヌロビオース類、リコボース、マルトース、イソマルトトリオース、メリビオース、ネオピフコース、ネオケストース、エルロース類、6- α -ガラクトシルガラクトース、コージビオース、マルツロース、メレチトース、ツラノース、ソホロース、ゲンチオオリゴ糖類、ピシアノース、プリメベロース、サンピオース、リコビオース、リコトリオース、ソラビオース、ストロハントビオース、ジギランドビオース、オドロトリオース、フンギテトラオースおよび β -1, 3キシロオリゴ糖から成る群から選ばれるものである第(3)項または第(4)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(11) グリコシド誘導体が、単糖類またはオリゴ糖の水酸基が非糖成分である-O-R⁷、-S-R⁸または-N-R⁹(式中、R⁷、R⁸およびR⁹はそれぞれ置換されていてもよい炭化水素基を示す。)で置換されたものである第(3)項または第(4)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(12) R⁷、R⁸およびR⁹が、それぞれ(i)ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基およびC₁₋₁₀アルコキシ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₁₋₃₀アルキル基、(ii)ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基およびC₁₋₁₀アルコキシ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₂₋₄アルケニル基、(iii)ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基およびC₁₋₁₀アルコキシ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₂₋₄アルキニル基、(iv)ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基およびC₁₋₁₀アルコキシ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₆₋₁₂アリール基、または(v)ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基およびC₁₋₁₀アルコキシ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₇₋₁₄アラルキル基である第(11)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(13) グリコシド誘導体がn-オクチルグルコシド、n-オクチルガラクトシド、n-オクチルマンノシド、n-オクチルチオグルコシド、n-オクチルチオガラクトシド、n-オクチルチオマンノシド、ステアシルグリコシド、ステアシルガラクトシド、ステアシルマンノシド、ステアシルチオグリコシド、ステアシルチオガラク

トシド、ステアシルチオマンノシド、フェニルグルコシド、フェニルガラクトシドおよびフェニルマンノシドから成る群から選ばれるものである第(3)項または第(4)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(14) QがYであって、Yで示される糖残基の糖が、水酸基がC₁₋₁₀アルキルカルボニル基、フェニルカルボニル基またはC₁₋₂₀アルキル基で置換されていてもよい単糖類、オリゴ糖またはグリコシド誘導体である第(2)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(15) 単糖類がガラクトース、マンノース、ガラクトサミンまたはグルコサミンである第(14)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(16) オリゴ糖がメリビオース、ゲンチオビオースまたはイソマルトトリオースである第(14)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(17) グリコシド誘導体がn-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシドまたはフェニルグルコシドである第(14)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(18) 水酸基が置換されていてもよいアミノ基で置換された単糖類が、C₁₋₆アルキルカルボニル基またはフェニルカルボニル基で2-アミノ基が置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミンである第(4)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

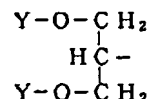
(19) QがYであって、Yで示される糖残基の糖が、①水酸基がC₁₋₆アルキルカルボニル基で置換されていてもよいガラクトースまたはマンノース、②水酸基がフェニルカルボニル基で置換されていてもよいメリビオース、ゲンチオビオースまたはイソマルトトリオース、③n-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシドまたはフェニルグルコシド、④C₁₋₁₀アルキルカルボニル基またはフェニルカルボニル基で置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミンである第(2)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(20) QがYであって、Yで示される糖残基の糖がガラクトース、マンノース、メリビオース、ゲンチオビオース、イソマルトトリオース、n-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシド、フェニルグルコシド、ガラクトサミン、N-ベンゾイルガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、グルコサミン、N-ベンゾイルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミンである第(2)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(21) Qが式

[0042]

[化39]



[0043]であって、Yで示される糖残基の糖が単糖類である第(2)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(22) 単糖類がガラクトース、マンノース、グルコースである第(21)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(23) 核酸残基が、ヒポキサンチン-9-イル、グアニン-9-イル、アデニン-9-イル、ウラシル-1-イル、チミン-1-イルおよびシトシン-1-イルから成る群から選ばれたものである第(2)項〜第(22)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(24) X^1 が①OH基、②SH基、③ C_{1-5} アルキル基、④ C_{1-5} アルコキシ基、⑤ C_{1-5} モノアルキルアミノ基、⑥ハロゲン原子、 C_{1-10} アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、 C_{1-10} アルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれた1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい C_{6-11} アリール基、または⑦ C_{1-5} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-6} アルキニル基、 C_{5-6} シクロアルキル基、 C_{5-7} シクロアルケニル基、 C_{7-11} アラールキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{6-14} アリールオキシ基、 C_{1-6} アルキルカルボニル基、 C_{6-14} アリールカルボニル基、 C_{1-6} アルカノイルオキシ基、 C_{6-14} アリールカルボニルオキシ基、カルボキシル基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、カルバモイル基、 N -モノ- C_{1-4} アルキルカルバモイル基、 N,N -ジ- C_{1-4} アルキルカルバモイル基、ハロゲン原子、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲノ- C_{1-4} アルキル基、オキソ基、アミジノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-又はジ- C_{1-4} アルキルアミノ基、OH基およびニトロ基から成る群から選ばれた1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれた1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環であり、 X^4 および X^5 がそれぞれOH基、SH基、 C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基または C_{1-5} モノアルキルアミノ基である第(2)項〜第(23)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(25) C_{6-11} アリール基がフェニル基またはナフチル基であり、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれた1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環が2-または3-チエニル、2-または3-フリル、2-または3-ピロリル、2-、3-または4-ピリジル、2-、4-または5-オキサゾリル、2-、4-または5-チアゾリル、3-、4-または5-ピラゾリル、2-、4-または5-イミダゾリル、3-、4-または5-イソオキサゾリル、3-、4-または5-イソチアゾリル、3-または5-(1,2,4-オキサジアゾリル)、1,3,4-オキサジアゾリル、3-または5-(1,2,4-チアジアゾリル)、1,3,4-チアジアゾリル、4-または5-(1,2,3-チアジアゾリル)、1,2,5-チアジアゾリル、1,2,3-トリアゾリル、

1,2,4-トリアゾリル、1H-または2H-テトラゾリル、 N -オキシド-2-、3-または4-ピリジル、2-、4-または5-ピリミジニル、 N -オキシド-2-、4-または5-ピリミジニル、チオモルホリニル、モルホリニル、オキソイミダジニル、ジオキサトリアジニル、ピロリジニル、ピベリジニル、ピラニル、チオピラニル、1,4-オキサジニル、1,4-チアジニル、1,3-チアジニル、ピベラジニル、トリアジニル、オキサトリアジニル、3-または4-ピリダジニル、ピラジニル、 N -オキシド-3-または4-ピリダジニル、ベンゾフリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、テトラゾロ〔1,5-b〕ピリダジニル、トリアゾロ〔4,5-b〕ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フトラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、1,8-ナフチリジニル、プリニル、プテリジニル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナントリジニル、クロマニル、ベンゾオキサジニル、フェナジニル、フェノチアジニルまたはフェノキサジニルである第(24)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(26) X^1 がOH基、SH基、 C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基、 C_{1-5} モノアルキルアミノ基、またはハロゲン原子、 C_{1-10} アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、 C_{1-10} アルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれた1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいフェニル基であり、 X^4 および X^5 がそれぞれOH基、SH基、 C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基、 C_{1-5} モノアルキルアミノ基である第(2)項〜第(23)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(27) X^1 がOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-アルコキシフェニル基、(o, m, p)-アルキルフェニル基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選ばれたものであり、 X^4 および X^5 がそれぞれOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選ばれたものである第(2)項〜第(23)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(28) X^1 がOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、フェニル基、(o, m, p)- C_{1-10} アルコキシフェニル基、(o, m, p)- C_{1-10} アルキルフェニル基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選ばれたものであり、 X^4 および X^5 がそれぞれOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選ばれたものである第(2)項〜第(23)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(29) X^1 がOH基、SH基、メチル基またはフェニル基であり、 X^4 および X^5 がそれぞれOH基、SH基、

30

SH基、メチル基またはフェニル基である第(34)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【0046】

【化4 1】

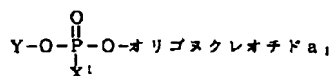
$$\begin{array}{c} \text{Y-O-CH}_2 \quad \text{O} \\ | \quad \parallel \\ \text{HC-O-P-O-オリゴヌクレオチド}_a \\ | \quad | \\ \text{Y-O-CH}_2 \quad \text{X}^1 \end{array}$$

【0047】〔式中、Yは糖残基を示し、X¹はOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₆モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、オリゴヌクレオチドa₂は配列番号：1～配列番号：31および配列番号：34から選ばれるヌクレオチド配列を示す。〕で表される第（2）項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(37) Yで示される糖残基の糖がガラクトース、マンノースまたはグルコースであり、X'がOH基、SH基、メチル基またはフェニル基ある第(36)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

20

【化40】



(38) オリゴヌクレオチド a_1 およびオリゴヌクレオチド a_2 が、配列番号：1、配列番号：31または配列番号：34で表されるものである第(34)項～第(37)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(35) Yで示される糖残基の糖がガラクトース、マンノース、メリピオース、ゲンチオピオース、イソマルトリオース、n-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシド、フェニルグルコシド、ガラクトサミン、N-ベンゾイルガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、グルコサミン、N-ベンゾイルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミンであり、X'がOH基、

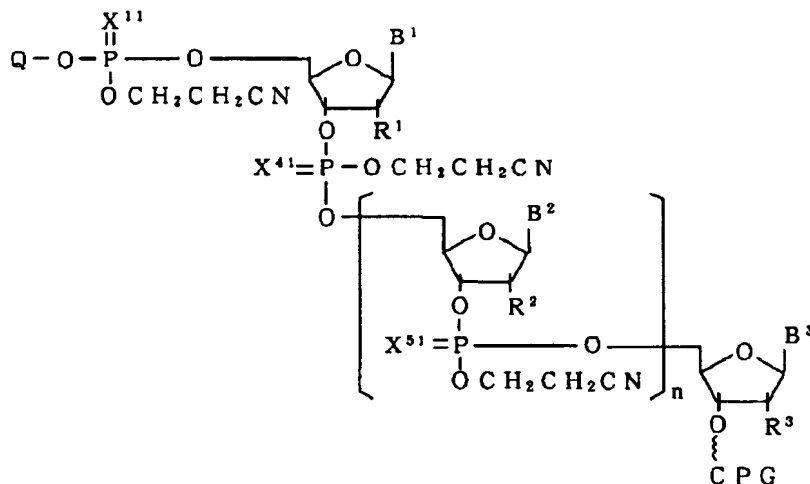
(39) オリゴヌクレオチド誘導体がアンチセンス・オリゴヌクレオチド誘導体である第(1)項～第(38)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(40) リボソームで包括されていることを特徴とする第(1)項～第(39)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【0048】(41)式

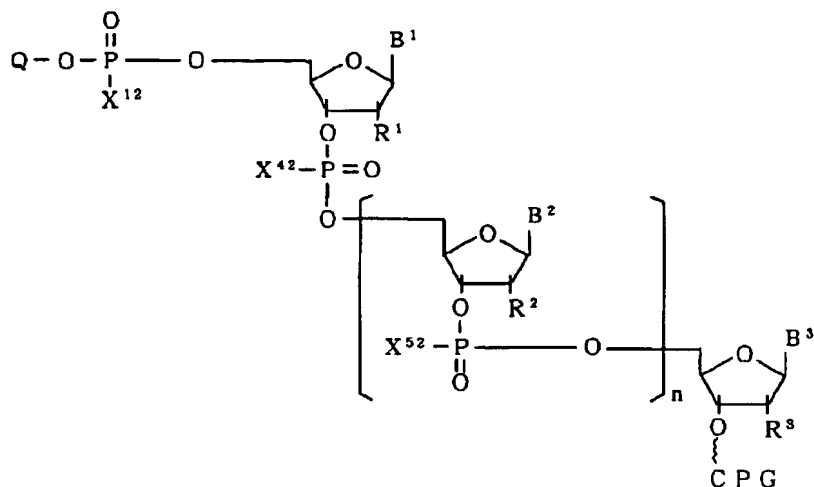
【0049】

【化 4 2】



31

【0050】〔式中、Q、B¹、B²、B³、R¹、R²、R³およびnは第(2)項記載と同意義を示し、X¹¹、X⁴¹およびX⁵¹はそれぞれOまたはSを示し、X⁵¹はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なっている*



32

*よく、CPGは固相担体を示す。〕で表される化合物、または式【0051】【化43】

【0052】〔式中、Q、B¹、B²、B³、R¹、R²、R³およびnは第(2)項記載と同意義を示し、X¹²、X⁴²およびX⁵²はそれぞれC₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、X⁵²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なっている*よく、CPGは固相担体を示す。〕で表される化合物の保護基を除去することを特徴とする第(2)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体の製造法。

(42) 第(1)項～第(40)項記載のいずれかのオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩を含有することを特徴とする遺伝子発現抑制剤。

(43) 悪性腫瘍、ウイルス疾患または炎症を引き起こす原因となる遺伝子の発現抑制剤である第(42)項記載の遺伝子発現抑制剤。

(44) 遺伝子発現抑制が、(i) DNAからプレmRNAへの転写の抑制、(ii) プレmRNAから成熟mRNAへのスプライシングの抑制または(iii) 成熟mRNAからタンパク質への翻訳の抑制である第(42)項または第(43)項記載の遺伝子発現抑制剤。

(45) 悪性腫瘍を引き起こす原因となる遺伝子がsrc、fps、yes、ros、myb、myc、erb、rel、mos、abl、ras、fos、fes、fms、sis、raf、neuおよびp53から成る群から選ばれる遺伝子であり、ウイルス疾患を引き起こす原因となる遺伝子がエイズウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、パピローマウイルス、ポリオウイルス、ピコルナウイルスおよびアデノウイルスから成る群から選ばれる遺伝子であり、炎症を引き起こす原因となる遺伝子がICAM-1、ELAM-

1およびVLAAMから成る群から選ばれる遺伝子である第(43)項記載の遺伝子発現抑制剤。

(46) 遺伝子がICAM-1遺伝子である第(42)項記載の遺伝子発現抑制剤。

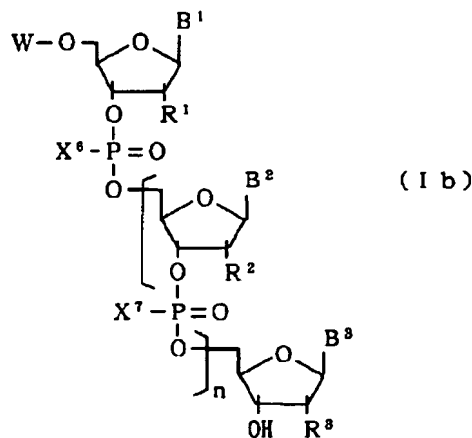
(47) 第(1)項～第(40)項記載のいずれかのオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩を含有することを特徴とするPTCA後の血管再狭窄抑制剤。

【0053】〔C〕下記の第(1)項～第(57)項に示すオリゴヌクレオチド誘導体(Ib)またはその塩、その製造法および用途

(1) 式

【0054】

【化44】



40

50

【0055】〔式中、Wは水素原子または保護基を示し、B¹、B²およびB³はそれぞれ核酸残基を示し、B²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なっている*よく、CPGは固相担体を示す。〕で表される化合物、または式【0051】【化43】

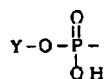
33

でもよく、 X^6 および X^7 はそれぞれOH基、SH基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{1-6} モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、 X^7 はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なっているとしてもよく、 X^6 および X^7 の少なくとも1つは置換されていてもよい芳香環基を示し、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、 C_{1-6} アルコキシ基または C_{1-6} アルコシアルキルオキシ基を示し、 R^2 はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なっているとしてもよく、nは1~98の整数を示す。) 10
で表されるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド誘導体 (I b) またはその塩。

(2) Wで表される保護基が、(i) 式

【0056】

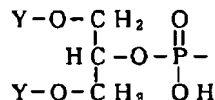
【化45】



【0057】(式中、Yは糖残基を示す。) で表される基、(ii) 式

【0058】

【化46】

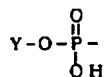


【0059】(式中、Yは糖残基を示す。) で表される基、(iii) ハロゲン原子で置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基、(iv) ハロゲン原子または C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい C_{6-11} アリール基、(v) ハロゲン原子または C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい C_{7-12} アララルキル基、(vi) ハロゲン原子で置換されていてもよい C_{1-6} アルキルカルボニル基、(vii) フェニルオキシカルボニル基、(viii) C_{7-12} アララルキルカルボニル基、(ix) ピラニル基、(x) フラニル基、(xi) シリル基、(xii) 1ないし3個のメトキシ基で置換されていてもよいトリチル基または(xiii) メトキシ基で置換されていてもよいフェニルキサンテニル基である第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(3) Wが水素原子または式

【0060】

【化47】

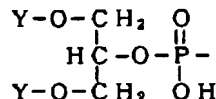


【0061】または

【0062】

【化48】

34



【0063】(式中、Yは糖残基を示す。) で表される基である第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(4) Yで示される糖残基の糖が、①置換されていてもよい単糖類、②置換されていてもよいオリゴ糖および③前記の単糖類または前記のオリゴ糖のグリコシド誘導体からなる群より選ばれたものである第(2)項または第(3)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(5) Yで示される糖残基の糖が、(i) 水酸基(好ましくはヘミアセタール性水酸基以外の水酸基)が①ハロゲン原子、 C_{1-10} アルキルカルボニル基、ニトロ基、 C_{1-10} アルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいアシル基、②ハロゲン原子、 C_{1-10} アルキルカルボニル基、ニトロ基、 C_{1-10} アルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいアルキル基および③置換されていてもよいアミノ基から成る群から選ばれる1ないし4個程度の置換基で置換されていてもよい単糖類、

(ii) 水酸基(好ましくはヘミアセタール性水酸基以外の水酸基)が①ハロゲン原子、 C_{1-10} アルキルカルボニル基、ニトロ基、 C_{1-10} アルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいアシル基、②ハロゲン原子、 C_{1-10} アルキルカルボニル基、ニトロ基、 C_{1-10} アルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいアルキル基および③置換されていてもよいアミノ基から成る群から選ばれる1ないし4個程度の置換基で置換されていてもよいオリゴ糖または(iii) 上記の単糖類またはオリゴ糖の水酸基が非糖成分である $-O-R^7$ 、 $-S-R^8$ または $-N-R^9$ (式中、 R^7 、 R^8 および R^9 はそれぞれ置換されていてもよい炭化水素基を示す。) で置換されたグリコシド誘導体である第(2)項または第(3)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(6) 単糖類が5炭糖アルドース、5炭糖ケトース、6炭糖アルドースまたは6炭糖ケトースである第(4)項または第(5)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(7) 5炭糖アルドースがリボース、アラビノース、キシロースまたはリキソースであり、5炭糖ケトースがリブロースまたはキシロロースであり、6炭糖アルドースがアロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトースまたはタロースであり、6炭糖ケトースがブシコース、フルクトース、ソル

ボースまたはタガトースである第(6)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(8) オリゴ糖がラクトース、 α 、 α -トレハロース、N-アセチルノイラミニルラクトース、ジフコシルラクトース、フコシルラクトース、ラクツロース、ゲンチアノース、イソリクノース類、リクノース類、ブランテオース、スクロース、ピフルコース、1, 6-ジグルコシルマンニトール、ガラクトシルスクロース6- β -グルコシルマンニトール、ラミナリビオース、イヌロビオース類、リコボース、マルトース、イソマルトリオース、メリビオース、ネオピフコース、ネオケストース、エルロース類、6- α -ガラクトシルガラクトース、コージビオース、マルツロース、メレチトース、ツラノース、ソホロース、ゲンチオオリゴ糖類、ピシアノース、プリメベロース、サンピオース、リコビオース、リコトリオース、ソラビオース、ストロハントビオース、ジギランドビオース、オドロトリオース、フンギテトラオースおよび β -1, 3キシロオリゴから成る群から選ばれるものである第(4)項または第(5)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(9) グリコシド誘導体が、単糖類またはオリゴ糖の水酸基が非糖成分である-O-R⁷、-S-R⁸または-N-R⁹(式中、R⁷、R⁸およびR⁹はそれぞれ置換されていてもよい炭化水素基を示す。)で置換されたものである第(4)項または第(5)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(10) R⁷、R⁸およびR⁹が、それぞれ(i)ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基およびC₁₋₁₀アルコキシ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₁₋₃₀アルキル基、(ii)ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基およびC₁₋₁₀アルコキシ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₂₋₄アルケニル基、(iii)ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基およびC₁₋₁₀アルコキシ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₂₋₄アルキニル基、(iv)ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基およびC₁₋₁₀アルコキシ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₆₋₁₂アリール基、または(v)ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基およびC₁₋₁₀アルコキシ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₇₋₁₄アラルキル基である第(9)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(11) グリコシド誘導体がn-オクチルグルコシド、n-オクチルガラクトシド、n-オクチルマンノシド、n-オクチルチオグルコシド、n-オクチルチオガラクトシド、n-オクチルチオマンノシド、ステアリルグリ

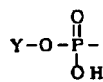
コシド、ステアリルガラクトシド、ステアリルマンノシド、ステアリルチオグリコシド、ステアリルチオガラクトシド、ステアリルチオマンノシド、フェニルグルコシド、フェニルガラクトシドおよびフェニルマンノシドから成る群から選ばれるものである第(4)項または第(5)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(12) 水酸基が置換されていてもよいアミノ基で置換された単糖類が、C₁₋₆アルキルカルボニル基またはフェニルカルボニル基で2-アミノ基が置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミンである第(5)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(13) Wが水素原子または式

[0064]

[化49]



[0065]であって、Yで示される糖残基の糖が、水酸基がC₁₋₁₀アルキルカルボニル基、フェニルカルボニル基またはC₁₋₂₀アルキル基で置換されていてもよい単糖類、オリゴ糖またはグリコシド誘導体である第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(14) 単糖類がガラクトース、マンノース、ガラクトサミンまたはグルコサミンである第(13)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

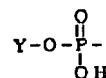
(15) オリゴ糖がメリビオース、ゲンチオビオースまたはイソマルトリオースである第(13)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(16) グリコシド誘導体がn-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシドまたはフェニルグルコシドである第(13)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(17) Wが水素原子または式

[0066]

[化50]

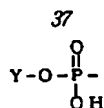


[0067]であって、Yで示される糖残基の糖が、①水酸基がC₁₋₆アルキルカルボニル基で置換されていてもよいガラクトースまたはマンノース、②水酸基がフェニルカルボニル基で置換されていてもよいメリビオース、ゲンチオビオースまたはイソマルトリオース、③n-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシドまたはフェニルグルコシド、④C₁₋₁₀アルキルカルボニル基またはフェニルカルボニル基で置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミンである第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(18) Wが水素原子または式

[0068]

[化51]



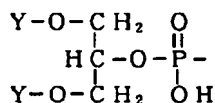
【0069】であって、Yで示される糖残基の糖がガラクトース、マンノース、メリピオース、ゲンチオピオース、イソマルトトリオース、n-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシド、フェニルグルコシド、ガラクトサミン、N-ベンゾイルガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、グルコサミン、N-ベンゾイルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミンである第10

(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(19)Wが酸素原子または式

【0070】

【化52】



【0071】であって、Yで示される糖残基の糖が単糖類である第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。20

(20)単糖類がガラクトース、マンノース、グルコースである第(19)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(21)核酸残基が、ヒポキサンチン-9-イル、グアニン-9-イル、アデニン-9-イル、ウラシル-1-イル、チミン-1-イルおよびシトシン-1-イルから成る群から選ばれたものである第(1)項〜第(20)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(22)X⁶およびX⁷がそれぞれ①OH基、②SH基、③C₁₋₅アルキル基、④C₁₋₅アルコキシ基、⑤C₁₋₅モノアルキルアミノ基、⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₆₋₁₁アリール基、または⑦C₁₋₈アルキル基、C₂₋₆アルケニル基、C₂₋₆アルキニル基、C₃₋₆シクロアルキル基、C₅₋₇シクロアルケニル基、C₇₋₁₁アラールキル基、C₆₋₁₄アリール基、C₁₋₆アルコキシ基、C₆₋₁₄アリールオキシ基、C₁₋₆アルキルカルボニル基、C₆₋₁₄アリールカルボニル基、C₁₋₆アルカノイルオキシ基、C₆₋₁₄アリールカルボニルオキシ基、カルボキシ基、C₁₋₆アルコキシカルボニル基、カルバモイル基、N-モノ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、N、N-ジ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、ハロゲン原子、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲン-C₁₋₄アルキル基、オキシ基、アミジノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-又はジC₁₋₄アルキルアミノ基、OH基およびニトロ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度の40

38

ヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環である第(1)項〜第(21)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(23)C₆₋₁₁アリール基がフェニル基またはナフチル基であり、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環が2-または3-チエニル、2-または3-フリル、2-または3-ピロリル、2-、3-または4-ピリジル、2-、4-または5-オキサゾリル、2-、4-または5-チアゾリル、3-、4-または5-ピラゾリル、2-、4-または5-イミダゾリル、3-、4-または5-イソオキサゾリル、3-、4-または5-イソチアゾリル、3-または5-(1,2,4-オキサジアゾリル)、1,3,4-オキサジアゾリル、3-または5-(1,2,4-チアジアゾリル)、1,3,4-チアジアゾリル、4-または5-(1,2,3-チアジアゾリル)、1,2,5-チアジアゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1H-または2H-テトラゾリル、N-オキシド-2-、3-または4-ピリジル、2-、4-または5-ピリミジニル、N-オキシド-2-、4-または5-ピリミジニル、チオモルホリニル、モルホリニル、オキソイミダジニル、ジオキソトリアジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピラニル、チオピラニル、1,4-オキサジニル、1,4-チアジニル、1,3-チアジニル、ピペラジニル、トリアジニル、オキソトリアジニル、3-または4-ピリダジニル、ピラジニル、N-オキシド-3-または4-ピリダジニル、ベンゾフリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、テトラゾロ〔1,5-b〕ピリダジニル、トリアゾロ〔4,5-b〕ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、1,8-ナフチリジニル、プリニル、プテリジニル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナントリジニル、クロマニル、ベンゾオキサジニル、フェナジニル、フェノチアジニルまたはフェノキサジニルである第(22)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(24)X⁶およびX⁷がそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基、またはハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいフェニル基である第(1)項〜第(23)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(25)X⁶およびX⁷がそれぞれOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-アルコキシフェニル基、(o, m, p)-ア

ルキルフェニル基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選ばれたものである第(1)項~第(23)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(26) X^6 および X^7 がそれぞれOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、フェニル基、(o, m, p)- C_{1-10} アルコキシフェニル基、(o, m, p)- C_{1-10} アルキルフェニル基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選ばれたものである第(1)項~第(23)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

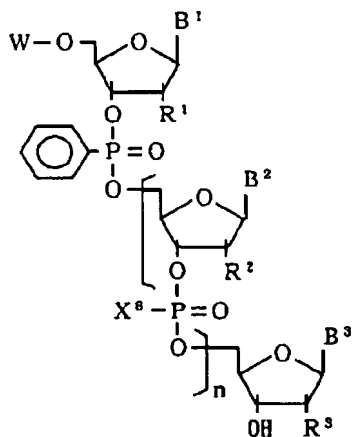
(27) X^6 および X^7 がそれぞれOH基、SH基、メチル基またはフェニル基である第(1)項~第(23)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(28) R^1 、 R^2 および R^3 がそれぞれ水素原子、OH基、フルオロ、クロロ、プロモ、メトキシ基、エトキシ基およびメトキシメチルオキシ基からなる群から選ばれたものである第(1)項~第(27)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(29) R^1 、 R^2 および R^3 が水素原子である第(1)項~第(27)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

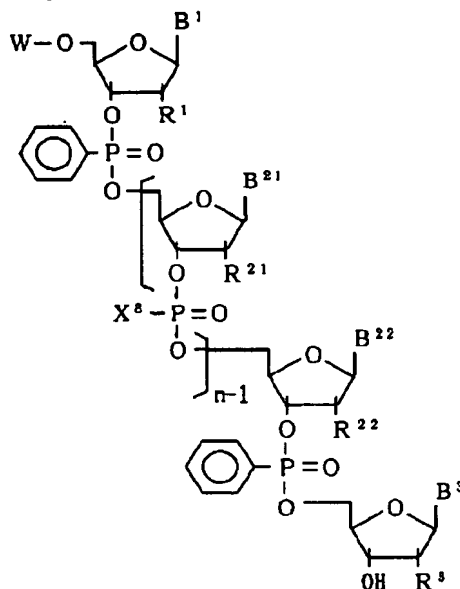
(30) n が1~38の整数である第(1)項~第(29)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(31) 式
【0072】
【化53】



【0073】〔式中、Wは水素原子または保護基を示し、 B^1 、 B^2 および B^3 はそれぞれ核酸残基を示し、 B^2 は n の繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、 X^6 はOH基、SH基、 C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基、 C_{1-5} モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、 C_{1-5} アルコキシ基または C_{1-5} アルコキシアルキルオキシ基を示し、 R^2 は n の繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、 n は1~98の整数を示す。〕で表わされるヌクレオチド配列を有する第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(32) 式
【0074】
【化54】



【0075】〔式中、Wは水素原子または保護基を示し、 B^1 、 B^{21} 、 B^{22} および B^3 はそれぞれ核酸残基を示し、 B^{21} は n の繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、 X^6 はOH基、SH基、 C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基、 C_{1-5} モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ水素原子、OH基、ハロゲン原子、 C_{1-5} アルコキシ基または C_{1-5} アルコキシアルキルオキシ基を示し、 R^2 は n の繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、 n は1~98の整数を示す。〕で表わされるヌクレオチド配列を有する第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(33) B^1 、 B^2 および B^3 で表される核酸残基が、ヒポキサンチン-9-イル、グアニン-9-イル、アデニン-9-イル、ウラシル-1-イル、チミン-1-イルおよびシトシン-1-イルから成る群から選ばれたものである第(31)項または第(32)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(34) X^6 が①OH基、②SH基、③ C_{1-5} アルキル基、④ C_{1-5} アルコキシ基、⑤ C_{1-5} モノアルキルアミノ基、⑥ハロゲン原子、 C_{1-10} アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、 C_{1-10} アルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれた1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい C_{6-11} アリール基、または⑦ C_{1-5} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-6} シクロアルキル基、 C_{5-7} シクロアルケニル基、 C_{7-11} アラリル基、

C₆₋₁₄アリール基、C₁₋₆アルコキシ基、C₆₋₁₄アリールオキシ基、C₁₋₆アルキルカルボニル基、C₆₋₁₄アリールカルボニル基、C₁₋₆アルカノイルオキシ基、C₆₋₁₄アリールカルボニルオキシ基、カルボキシル基、C₁₋₆アルコキシカルボニル基、カルバモイル基、N-モノ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、N,N-ジ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、ハロゲン原子、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲン-C₁₋₄アルキル基、オキソ基、アミジノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-又はジ-C₁₋₄アルキルアミノ基、OH基およびニトロ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環である第(31)項または第(32)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(35) C₆₋₁₁アリール基がフェニル基またはナフチル基であり、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環が2-または3-チエニル、2-または3-フリル、2-または3-ピロリル、2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-オキサゾリル、2-, 4-または5-チアゾリル、3-, 4-または5-ピラゾリル、2-, 4-または5-イミダゾリル、3-, 4-または5-イソオキサゾリル、3-, 4-または5-イソチアゾリル、3-または5-(1,2,4-オキサジアゾリル)、1,3,4-オキサジアゾリル、3-または5-(1,2,4-チアジアゾリル)、1,3,4-チアジアゾリル、4-または5-(1,2,3-チアジアゾリル)、1,2,5-チアジアゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1H-または2H-テトラゾリル、N-オキシド-2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-ピリミジニル、N-オキシド-2-, 4-または5-ピリミジニル、チオモルホリニル、モルホリニル、オキソイミダジニル、ジオキソトリアジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピラニル、チオピラニル、1,4-オキサジニル、1,4-チアジニル、1,3-チアジニル、ピペラジニル、トリアジニル、オキソトリアジニル、3-または4-ピリダジニル、ピラジニル、N-オキシド-3-または4-ピリダジニル、ベンゾフリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、テトラゾロ〔1,5-b〕ピリダジニル、トリアゾロ〔4,5-b〕ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、1,8-ナフチリジニル、プリニル、プテリジニル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナントリジニル、クロマニル、ベンゾオキサジニル、フェナジニル、フェノチアジニルまたはフェ

10

20

30

40

50

ノキサジニルである第(34)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(36) X⁸が①OH基、②SH基、③C₁₋₅アルキル基、④C₁₋₅アルコキシ基、⑤C₁₋₅モノアルキルアミノ基、または⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいフェニル基である第(31)項~第(35)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(37) X⁸がOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-アルコキシフェニル基、(o, m, p)-アルキルフェニル基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選ばれたものである第(31)項~第(35)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(38) X⁸がOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルコキシフェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルキルフェニル基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選ばれたものである第(31)項~第(35)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(39) X⁸がOH基、SH基、メチル基またはフェニル基である第(31)項~第(35)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(40) R¹、R²およびR³がそれぞれ水素原子、OH基、フルオロ、クロロ、ブロモ、メトキシ基、エトキシ基およびメトキシメチルオキシ基からなる群から選ばれたものである第(31)項~第(39)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(41) R¹、R²およびR³が水素原子である第(31)項~第(39)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(42) nが1~38の整数である第(31)項~第(41)項記載のいずれかのオリゴヌクレオチド誘導体。

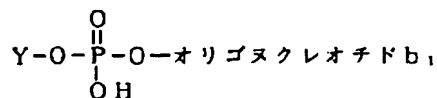
(43) nが1~28の整数である第(31)項~第(41)項記載のいずれかのオリゴヌクレオチド誘導体。

(44) nが4~38の整数であり、n-1の繰返しにおいて、第1番目のX⁸がフェニル基であり、第n-1番目のX⁸がフェニル基である第(32)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

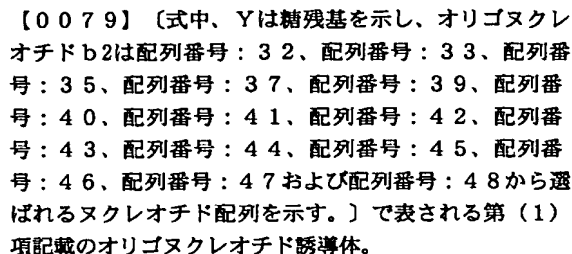
(45) 式

[0076]

[化55]



* 【化5 6】

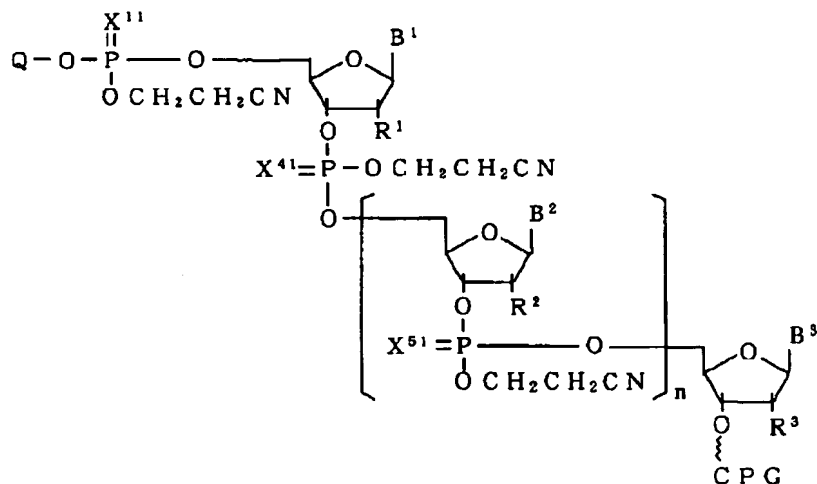


(49) Yで示される糖残基の糖がガラクトース、マンノースまたはグルコースである第(48)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

(50) Yで示される糖残基の糖がガラクトースである
第(48)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【0081】

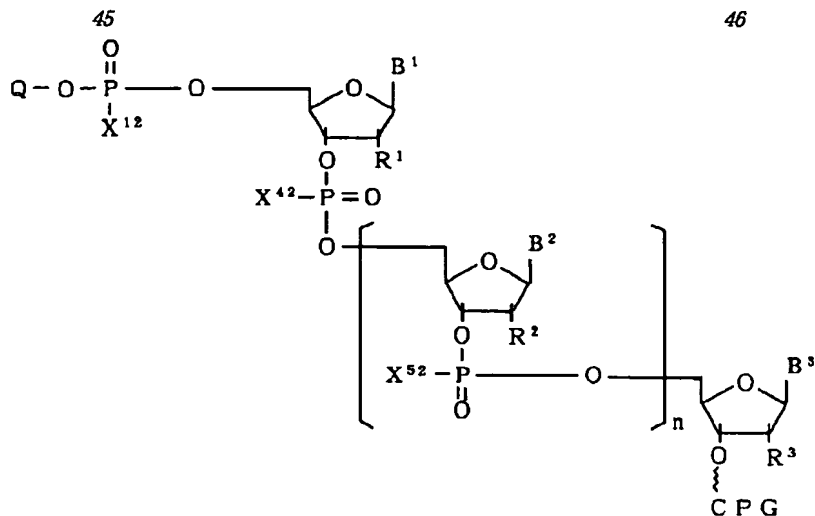
【化 5 7】



よく、CPGは固相担体を示す。)で表される化合物、
または式

【0083】

【化58】



【0084】〔式中、Q、B¹、B²、B³、R¹、R²、R³およびnは第(2)項記載と同意義を示し、X¹²、X⁴²およびX⁵²はそれぞれC₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、X⁵²はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、CPGは固相担体を示す。〕で表される化合物の保護基を除去することを特徴とする第(1)項記載のオリゴヌクレオチド誘導体の製造法。

(52) 第(1)項～第(50)項記載のいずれかのオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩を含有することを特徴とする遺伝子発現抑制剤。

(53) 悪性腫瘍、ウイルス疾患または炎症を引き起こす原因となる遺伝子の発現抑制剤である第(52)項記載の遺伝子発現抑制剤。

(54) 遺伝子発現抑制が、(i) DNAからプレmRNAへの転写の抑制、(ii) プレmRNAから成熟mRNAへのスプライシングの抑制または(iii) 成熟mRNAからタンパク質への翻訳の抑制である第(52)項または第(53)項記載の遺伝子発現抑制剤。

(55) 悪性腫瘍を引き起こす原因となる遺伝子がsrc、fps、yes、ros、myb、myc、erb、rel、mos、abl、ras、fos、fes、fms、sis、raf、neuおよびp53から成る群から選ばれる遺伝子であり、ウイルス疾患を引き起こす原因となる遺伝子がエイズウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、パピローマウイルス、ポリオウイルス、ピコルナウイルスおよびアデノウイルスから成る群から選ばれる遺伝子であり、炎症を引き起こす原因となる遺伝子がICAM-1、ELAM-1およびVLAMから成る群から選ばれる遺伝子である第(53)項記載の遺伝子発現抑制剤。

(56) 遺伝子がICAM-1遺伝子である第(52)項記載の遺伝子発現抑制剤。

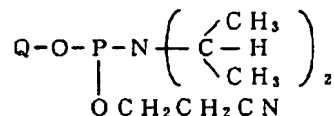
(57) 第(1)項～第(50)項記載のいずれかのオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩を含有することを特徴とするPTCA後の血管再狭窄抑制剤。

〔D-1〕 下記の第(1)項～第(5)項に示す糖誘導体

(1) 式、

【0085】

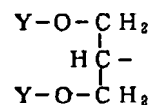
〔化59〕



【0086】〔式中、QはYまたは式

【0087】

〔化60〕



【0088】で表される基を示し、Yは糖残基を示す。〕で表される糖誘導体。

(2) QがYであり、Yで示される糖残基の糖が①ガラクトース、マンノース、メリビオース、ゲンチオビオースおよびイソマルトトリオースまたはこれらの水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基またはベンゾイル基で置換されているもの、②グルコシドおよびチオグルコシドまたはこれらの水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基、ベンゾイル基またはC₁₋₂₀アルキル基で置換されているもの、または③グルコサミンおよびガラクトサミンまたはこれらの水酸基がハロゲン原子で置換されていてもよいC₁₋₅アルキルカルボニル基あるいはベンゾイル基で置換されているものである第(1)項記載の糖誘導体。

(3) QがYであり、Yで示される糖残基の糖が1,2,3,4-O-テトラアセチルガラクトース、1,2,3,4-O-テトラ

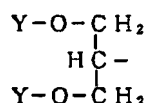
47

アセチルマンノース、1-0-*n*-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド、1-0-*n*-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシド、1-0-フェニル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド、1,3,4-0-トリベンゾイル、2-*N*-ベンゾイルガラクトサミン、1,3,4-0-トリアセチル、2-*N*-アセチルガラクトサミン、1,3,4-0-トリアセチル、2-*N*-アセチルグルコサミン、1,3,4-0-トリベンゾイル、2-*N*-トリフルオロアセチルガラクトサミン、1,3,4-0-トリベンゾイル、2-*N*-トリフルオロアセチルグルコサミン、ヘプタベンゾイルメリビオース、ヘプタベンゾイルゲンチオビオースまたはオクタベンゾイルイソマルトリオースである第(1)項記載の糖誘導体。

(4) Qが式

【0089】

【化61】

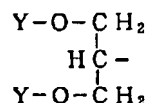


【0090】〔式中、Yは糖残基を示す。〕で表される基であり、Yで示される糖残基の糖が水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基で置換されていてもよい単糖類である第(1)項記載の糖誘導体。

(5) Qが式

【0091】

【化62】



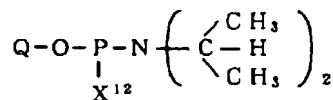
【0092】〔式中、Yは糖残基を示す。〕で表される基であり、Yで示される糖残基の糖が水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基で置換されていてもよいガラクトース、マンノースまたはグルコースである第(1)項記載の糖誘導体。

【0093】〔D-2〕下記の第(1)項～第(7)項に示す糖誘導体

(1) 式、

【0094】

【化63】

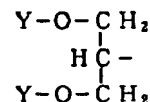


【0095】〔式中、QはYまたは式

【0096】

【化64】

48



【0097】で表される基を示し、Yは糖残基を示し、X^{1,2}はC₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示す。〕で表される糖誘導体。

(2) QがYであり、Yで示される糖残基の糖が①ガラクトース、マンノース、メリビオース、ゲンチオビオースおよびイソマルトリオースまたはこれらの水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基またはベンゾイル基で置換されているもの、

②グルコシドおよびチオグルコシドまたはこれらの水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基、ベンゾイル基またはC₁₋₂₀アルキル基で置換されているもの、または

③グルコサミンおよびガラクトサミンまたはこれらの水酸基がハロゲン原子で置換されていてもよいC₁₋₅アルキルカルボニル基あるいはベンゾイル基で置換されているものである第(1)項記載の糖誘導体。

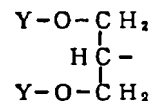
(3) QがYであり、Yで示される糖残基の糖が1,2,3,4-0-テトラアセチルガラクトース、1,2,3,4-0-テトラアセチルマンノース、1-0-*n*-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド、1-0-*n*-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシド、1-0-フェニル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド、1,3,4-0-トリベンゾイル、2-*N*-ベンゾイルガラクトサミン、1,3,4-0-トリアセチル、2-*N*-アセチルガラクトサミン、1,3,4-0-トリアセチル、2-*N*-アセチルグルコサミン、1,3,4-0-トリベンゾイル、2-*N*-トリフルオロアセチルガラクトサミン、1,3,4-0-トリベンゾイル、2-*N*-トリフルオロアセチルグルコサミン、ヘプタベンゾイルメリビオース、ヘプタベンゾイルゲンチオビオースまたはオクタベンゾイルイソマルトリオースである第(1)項記載の糖誘導体。

(4) QがYであり、Yで示される糖残基の糖が1-0-*n*-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシドまたは1-0-*n*-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシドである第(1)項記載の糖誘導体。

(5) Qが式

【0098】

【化65】



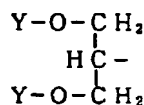
【0099】〔式中、Yは糖残基を示す。〕で表される基であり、Yで示される糖残基の糖が水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基で置換されていてもよい単糖類である第(1)項記載の糖誘導体。

(6) Qが式

49

【0100】

【化66】



【0101】（式中、Yは糖残基を示す。）で表される基であり、Yで示される糖残基の糖が水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基で置換されていてもよいガラクトース、マンノースまたはグルコースである第（1）項記載の糖誘導体。

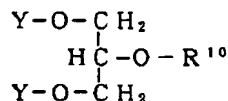
（7）X¹²がC₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基、またはハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい置換されていてもよいフェニル基である第（1）項～第（6）項記載の糖誘導体。

【0102】（D-3）下記の第（1）項～第（4）項に示す糖誘導体

（1）式

【0103】

【化67】



【0104】（式中、Yは糖残基を示す。）で表される糖誘導体。

（2）Yで示される糖残基の糖が単糖類である第（1）項記載の糖誘導体。

（3）Yで示される糖残基の糖が水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基で置換されていてもよいガラクトース、マンノースまたはグルコースである第（1）項記載の糖誘導体。

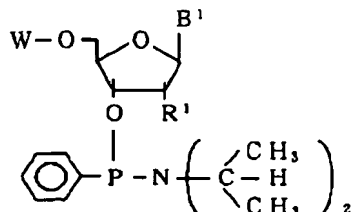
（4）Yで示される糖残基の糖が水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基で置換されていてもよいガラクトースである第（1）項記載の糖誘導体。

【E】下記の第（1）項～第（8）項に示すヌクレオチド誘導体

（1）式

【0105】

【化68】



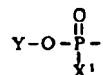
50

【0106】（式中、Wは水素原子または保護基を示し、B¹は核酸残基を示し、R¹は水素原子、OH基、ハロゲン原子、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅アルコシアルキルオキシ基を示す。）で表されるヌクレオチド誘導体。

（2）Wが水素原子、式

【0107】

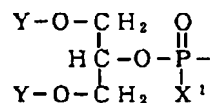
【化69】



【0108】または

【0109】

【化70】

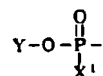


【0110】（式中、Yは糖残基を示し、X¹はOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示す。）で表される第（1）項記載のヌクレオチド誘導体。

（3）Wが水素原子または式

【0111】

【化71】

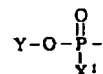


【0112】であり、Yで示される糖残基の糖が①ガラクトース、マンノース、メリビオース、ゲンチオビオースおよびイソマルトトリオースまたはこれらの水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基またはベンゾイル基で置換されているもの、②グルコシドおよびチオグルコシドまたはこれらの水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基、ベンゾイル基またはC₁₋₂₀アルキル基で置換されているもの、または③グルコサミンおよびガラクトサミンまたはこれらの水酸基がハロゲン原子で置換されていてもよいC₁₋₅アルキルカルボニル基あるいはベンゾイル基で置換されているものである第（1）項記載のヌクレオチド誘導体。

（4）Wが水素原子または式

【0113】

【化72】



【0114】であり、Yで示される糖残基の糖が1,2,3,4-O-テトラアセチルガラクトース、1,2,3,4-O-テトラアセチルマンノース、1-O-α-オクチル-2,3,4-O-トリベ

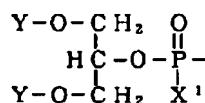
51

ンゾイルグルコシド、1-0-*n*-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシド、1-0-フェニル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド、1,3,4-0-トリベンゾイル、2-*N*-ベンゾイルガラクトサミン、1,3,4-0-トリアセチル、2-*N*-アセチルガラクトサミン、1,3,4-0-トリアセチル、2-*N*-アセチルグルコサミン、1,3,4-0-トリベンゾイル、2-*N*-トリフルオロアセチルガラクトサミン、1,3,4-0-トリベンゾイル、2-*N*-トリフルオロアセチルグルコサミン、ヘプタベンゾイルメリピオース、ヘプタベンゾイルゲンチオピオースまたはオクタベンゾイルイソマルトリオースである第(1)項記載のヌクレオチド誘導体。

(5) Wが水素原子または式

【0115】

【化73】

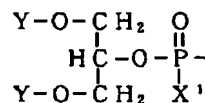


【0116】であり、Yで示される糖残基の糖が水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基で置換されていてもよい単糖類である第(1)項記載のヌクレオチド誘導体。

(6) Wが水素原子または式

【0117】

【化74】



【0118】であり、Yで示される糖残基の糖が水酸基がガラクトース、マンノースまたはグルコースである第(1)項記載のヌクレオチド誘導体。

(7) X¹が①OH基、②SH基、③C₁₋₅アルキル基、④C₁₋₅アルコキシ基、⑤C₁₋₅モノアルキルアミノ基、または⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいフェニル基である第(1)項～第(6)項記載のヌクレオチド誘導体。

(8) X¹がOH基、SH基、メチル基またはフェニル基である第(1)項～第(6)項記載のヌクレオチド誘導体。

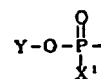
【0119】本明細書において、Wは水素原子または保護基を示す。Wで表される保護基としては、OH基を保護しうる基であれば何れの基であってもよい。例えば、

(1) 式

【0120】

【化75】

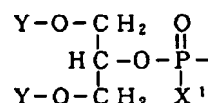
52



【0121】(式中、Yは糖残基を示し、X¹はOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示す。)で表される基、(ii) 式

【0122】

【化76】



【0123】(式中、Yは糖残基を示し、X¹はOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示す。)で表される基、(iii) ハロゲン原子(例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、ニトロ基などで置換されていてもよいC₁₋₆アルキル基(例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*n*-ブチル、*tert*-ブチルなど)、(iv) ハロゲン原子(例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、C₁₋₆アルキル基(例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*n*-ブチル、*tert*-ブチルなど)、フェニル基、ニトロ基などで置換されていてもよいC₆₋₁₁アリール基(例えば、フェニル、ナフチルなど)、(v) ハロゲン原子(例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、C₁₋₆アルキル基(例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*n*-ブチル、*tert*-ブチルなど)、フェニル基、ニトロ基などで置換されていてもよいC₇₋₁₂アラルキル基(例えば、ベンジルなど)、(vi) ハロゲン原子(例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)などで置換されていてもよいC₁₋₅アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、メチルカルボニル、エチルカルボニルなど)、(vii) フェニルオキシカルボニル基(例えば、ベンゾオキシカルボニルなど)、(viii) C₇₋₁₂アラルキルカルボニル基(例えば、ベンジルオキシカルボニルなど)、(ix) ピラニル基、(x) フラニル基、(xi) シリル基、(xii) 1ないし3個のメトキシ基などで置換されていてもよいトリチル基(例えば、トリチル、メトキシトリチル、ジメトキシトリチル、トリメトキシトリチルなど)、(xiii) メトキシ基などで置換されていてもよいフェニルキサンテニル基(例えば、フェニルキサンテニル、メトキシフェニルキサンテニルなど)などが用いられる。

【0124】本明細書において、Yは糖残基を示す。Yで表される糖残基の糖としては、それ自体公知のものが用いられ、化学合成されたものであってもよいし、天然のものであってもよい。具体的には、置換されていても

53

よい単糖類またはその縮合体などが用いられる。該単糖類としては、例えば置換されていてもよい5炭糖アルドース（例えば、リボース、アラビノース、キシロース、リキソースなど）、5炭糖ケトース（例えば、リブロース、キシロースなど）、6炭糖アルドース（例えば、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グルコース、イドース、ガラクトース、タロースなど）、6炭糖ケトース（例えば、プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトースなど）などが用いられる。該単糖類は、例えば水酸基が通常1ないし4個程度の置換基で置換されていてもよい。この置換基としては、例えば、置換されていてもよいアシル基、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアミノ基などが挙げられる。該置換されていてもよいアシル基のアシル基としては、 C_{1-10} アルキルカルボニル基（例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなどの C_{1-6} アルキルカルボニル基）、フェニルカルボニル基、 C_{7-10} アラルキルカルボニル基（例えば、ベンジルカルボニル基など）、 C_{1-10} アルコキシカルボニル基（例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、 n -プロポキシカルボニルなど）、フェニルオキシカルボニル基（例えば、ベンゾオキシカルボニル基など）、ナフチルオキシカルボニル基、 C_{7-10} アラルキルオキシカルボニル基（例えば、ベンジルオキシカルボニル基など）、アリルスルフェニル基（例えば、フェニルスルフェニル、ナフチルスルフェニルなど）などが用いられる。該アシル基としては、例えば C_{1-10} アシル基などが好ましく、例えば C_{1-10} アルキルカルボニル基（例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなどの C_{1-6} アルキルカルボニル基）、フェニルカルボニル基、ベンジルカルボニル基などが好ましい。該アシル基の置換基としては、例えば、ハロゲン原子（例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど）、 C_{1-10} アルキルカルボニル基（例えば、ホルミル、メチルカルボニル、エチルカルボニルなど）、ニトロ基、 C_{1-10} アルキル基（例えば、メチル、エチルなど）、 C_{1-10} アルコキシ基（例えば、メトキシ、エトキシなど）、フェニル基、ナフチル基などが用いられ、置換基の数は通常1ないし5個程度、好ましくは1ないし3個程度である。該置換されていてもよいアルキル基のアルキル基としては、例えば C_{1-20} アルキル基（例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、 i -プロピル、 n -ブチル、 n -ペンチル、 n -ヘキシル、 n -ヘプチル、 n -オクチルなど）、好ましくは C_{1-6} アルキル基（例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、 i -プロピル、 n -ブチル、 n -ペンチル、 n -ヘキシルなど）が用いられる。このアルキル基の置換基としては、例えばハロゲン原子（例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど）、 C_{1-10} アルキルカルボニル基（例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなどの C_{1-6} アルキルカルボニル基）、ニトロ基、 C_{1-10} アルキ

54

ル基（例えば、メチル、エチルなど）、 C_{1-10} アルコキシ基（例えば、メトキシ、エトキシなど）、フェニル基、ナフチル基などが用いられ、置換基の数は通常1ないし5個程度、好ましくは1ないし3個程度である。該置換されていてもよいアミノ基としては、例えば、式- NR^4R^5 （式中、 R^4 および R^5 はそれぞれ水素原子、置換されていてもよいアシル基または置換されていてもよいアルキル基を示す。）で表される基などが用いられる。 R^4 および R^5 で表される置換されていてもよいアシル基および置換されていてもよいアルキル基としては、前記と同様のものが用いられる。このアミノ基の置換の位置は、単糖類の2位が好ましい。このように、水酸基がアミノ基で置換された単糖類は、いわゆるアミノ糖である。このようなアミノ糖としては、具体的には、例えばアミノ基が上記の R^4 または（および） R^5 で置換されていてもよいグルコサミン、ガラクトサミン、 N -メチルグルコサミン、3-アミノ-3-デオキシグルコース、グロサミン、ネオサミンB、ネオサミンC、フコサミン、ラムノサミン、アミノマンヌロン酸、キノボサミンなどが好ましい。具体的には、例えば C_{1-6} アルキルカルボニル基、フェニルカルボニル基などで2-アミノ基が置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミン（例えば、グルコサミン、ガラクトサミン、 N -アセチルグルコサミン、 N -アセチルガラクトサミン、 N -ベンゾイルグルコサミン、 N -ベンゾイルガラクトサミンなど）などが好ましく、特にグルコサミン、 N -アセチルグルコサミン、 N -ベンゾイルグルコサミン、 N -ベンゾイルガラクトサミンなどが好ましい。上記した単糖類の中でも、例えば5炭糖アルドース（例えば、リボース、アラビノースなど）、6炭糖アルドース（例えば、グルコース、マンノース、ガラクトースなど）などがより好ましい。特に、ガラクトース、マンノース、グルコースなどが好適である。単糖類の水酸基の置換基としては、例えば C_{1-10} アルキルカルボニル基（例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなどの C_{1-6} アルキルカルボニル基）、フェニルカルボニル基などのアシル基や C_{1-20} アルキル基（例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、 i -プロピル、 n -ブチル、 n -ペンチル、 n -ヘキシル、 n -ヘプチル、 n -オクチルなど）などが好ましい。式（I）中のYの単糖類としては、具体的には水酸基が C_{1-6} アルキルカルボニル基で置換されていてもよい6炭糖アルドースなどが特に好ましい。より具体的には、例えばガラクトース、マンノース、1,2,3,4- O -テトラアセチルガラクトース、1,2,3,4- O -テトラアセチルマンノース、グルコサミン、 N -アセチルグルコサミン、 N -ベンゾイルグルコサミン、 N -ベンゾイルガラクトサミンなどが好ましい。

【0125】該単糖類の縮合体としては、例えば置換されていてもよいオリゴ糖、グリコシド誘導体などが用いられる。該オリゴ糖としては、例えば、前記の単糖類が

2ないし15個、好ましくは2ないし8個が縮合したものなどが用いられるが、例えば前記の単糖類が2ないし5個、好ましくは2ないし3個が縮合したものなども用いられる。具体的には、天然に遊離状および配糖体の構成成分として存在しているものなどが用いられる。例えば、(1)動物界に存在しているラクトース、 α 、 α -トレハロース、N-アセチルノイラミニルラクトース、ジフコシルラクトース、フコシルラクトース、ラクツロースなど、(2)植物界に存在しているゲンチアノース、イソリクノース類、リクノース類、ブランデオース、スクロース、ピフルコース、1,6-ジグルコシルマンニトール、ガラクトシルスクロース6- β -グルコシルマンニトール、ラミナリビオース、イヌロビオース類、リコボース、マルトース、イソマルトリオース、メリビオース、ネオピフルコース、ネオケストース、エルロース類、6- α -ガラクトシルガラクトース、コージビオース、マルツロース、メレチトース、ツラノースなど、(3)配糖体の構成成分として存在しているソホロース、ゲンチオオリゴ糖類、ピシアノース、プリメベロース、サンピビオース、リコビオース、リコトリオース、ソラビオース、ストロハントビオース、ジギランドビオース、オドロトリオース、フンギテトラオース、 β -1,3キシロオリゴ糖類などが用いられる。なかでも、例えばゲンチオビオース、メリビオース、イソマルトリオースなどが好ましい。上記オリゴ糖は、例えば水酸基が置換されていてもよい。この置換基としては、前記の単糖類の置換基と同様のもの、例えば置換されていてもよいアシル基、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアミノ基などが用いられる。該グリコシド誘導体としては、前記の単糖類若しくはオリゴ糖の水酸基が非糖成分であるアグリコンで置換されたグリコシド誘導体(例えば、O-グリコシド誘導体、S-グリコシド誘導体若しくはN-グリコシド誘導体)などが用いられる。該アグリコンとしては、例えばO-R⁷、-S-R⁸、-N-R⁹(式中、R⁷、R⁸およびR⁹はそれぞれ置換されていてもよい炭化水素基を示す。)などが用いられる。R⁷、R⁸およびR⁹で表される置換されていてもよい炭化水素基の炭化水素基としては、例えばアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アラールキル基などが用いられる。アルキル基としては、例えばC₁₋₃₀アルキル基(例えば、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル、ステアリルなど)、特にC₁₋₂₀アルキル基(例えば、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル、ステアリルなど)などが好ましい。アルケニル基としては、例えばC₂₋₄アルケニル基(例えば、アリル、プロペニルなど)などが用いられる。アルキニル基としては、例えばC₂₋₄アルキニル基

(例えば、エチニル、プロピニルなど)などが用いられる。アリール基としては、例えばフェニル基、ナフチル基などのC₆₋₁₂アリール基などが用いられる。アラールキル基としては、例えばC₇₋₁₄アラールキル基(例えば、ベンジル、フェニルエチル、ナフチルメチル、ナフチルエチルなど)などが用いられる。上記アルキル基、アルケニル基およびアルキニル基の置換基としては、例えばハロゲン原子(例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなど)、ニトロ基、C₁₋₁₀アルコキシ基(例えば、メトキシ、エトキシなど)などが用いられる。置換基の数は通常1ないし5個程度、好ましくは1ないし3個程度である。上記アリール基およびアラールキル基の置換基としては、例えばハロゲン原子(例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなど)、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基(例えば、メチル、エチルなど)、C₁₋₁₀アルコキシ基(例えば、メトキシ、エトキシなど)などが用いられる。置換基の数は通常1ないし5個程度、好ましくは1ないし3個程度である。R⁷、R⁸およびR⁹としては、それぞれC₁₋₃₀アルキル基(例えば、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル、ステアリルなど)、C₆₋₁₂アリール基(例えば、フェニル基、ナフチル基など)などが好ましい。該グリコシド誘導体としては、具体的には、例えばn-オクチルグルコシド、n-オクチルガラクトシド、n-オクチルマンノシド、n-オクチルチオグルコシド、n-オクチルチオガラクトシド、n-オクチルチオマンノシド、ステアリルグリコシド、ステアリルガラクトシド、ステアリルマンノシド、ステアリルチオグリコシド、ステアリルチオガラクトシド、ステアリルチオマンノシド、フェニルグルコシド、フェニルガラクトシド、フェニルマンノシドなどが好ましい。上記したなかでも、Yで表される糖残基の糖としては、例えばGal(ガラクトース)、Man(マンノース)、Glc(グルコース)、n-oct-Glc(n-オクチルグルコシド)、n-oct-SGlc(n-オクチルチオグルコシド)、PhGlc(フェニルグルコシド)、PhGal(フェニルガラクトシド)、GalN(ガラクトサミン)、N-AcGal(N-アセチルガラクトサミン)、N-BzGal(N-ベンゾイルガラクトサミン)、GuIN(グルコサミン)、N-AcGuI(N-アセチルグルコサミン)、Mel(メリビオース)、Gen(ゲンチオビオース)、Iso(イソマルトリオース)などが好ましい。特に、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体(1a)においては、Gal(ガラクトース)、Man(マンノース)、n-oct-Glc(n-オクチルグルコシド)、n-oct-SGlc(n-

ーオクチルーチオグルコシド)、PhGlc (フェニルグルコシド)、PhGal (フェニルガラクトシド)、GalN (ガラクトサミン)、N-AcGal (N-アセチルガラクトサミン)、N-BzGal (N-ベンゾイルガラクトサミン)、GulN (グルコサミン)、N-AcGul (N-アセチルグルコサミン)、Mel (メリピオース)、Gen (ゲンチオピオース)、Iso (イソマルトトリオース) などが好適である。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体 (I b) においては、Me1 (メリピオース)、Gen (ゲンチオピオース)、N-BzGal (N-ベンゾイルガラクトサミン) などが好適である。

【0126】本明細書において、X¹はOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示す。該C₁₋₅アルキル基としては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、i-ブチル、tert-ブチルなどが用いられる。該C₁₋₅アルコキシ基としては、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシなどが用いられる。該C₁₋₅モノアルキルアミノ基としては、メチルアミノ、エチルアミノ、n-プロピルアミノなどが用いられる。該置換されていてもよいフェニル基の置換基としては、例えばハロゲン原子 (例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基 (例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなどのC₁₋₆アルキルカルボニル基)、OH、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基 (例えば、メチル、エチルなど)、C₁₋₁₀アルコキシ基 (例えば、メトキシ、エトキシ、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、i-ブチル、tert-ブチルなど)、フェニル基、ナフチル基などが用いられ、置換基の数は通常1ないし5個程度、好ましくは1ないし3個程度である。該芳香環基としては、例えばアリール基、芳香族複素環基などが用いられる。

【0127】アリール基としては、例えばC₆₋₁₁アリール基 (例えば、フェニル基、ナフチル基など) などが用いられ、特にフェニル基が好適である。アリール基の置換基としては、例えばハロゲン原子 (例、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基 (例、ホルミル、アセチル、プロピオニル、n-ブチリル、iso-ブチリルなど)、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基 (例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチルなど)、C₁₋₁₀アルコキシ基 (例、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、iso-プロポキシ、n-ブトキシ、iso-ブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシなど)、フェニル基、ナフチル基などが挙げられる。置換基の数は1ないし5個程度、好ましくは1ないし3個程度である。芳香族複素環基としては、例えば窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度の

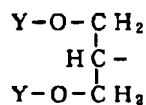
ヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子とを含有する5ないし13員の芳香族複素環基などが用いられ、特に5ないし9員の芳香族複素環基などが好適である。例えば2-または3-チエニル、2-または3-フリル、2-または3-ピロリル、2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-オキサゾリル、2-, 4-または5-チアゾリル、3-, 4-または5-ピラゾリル、2-, 4-または5-イミダゾリル、3-, 4-または5-イソチアゾリル、3-または5-(1, 2, 4-オキサジアゾリル)、1, 3, 4-オキサジアゾリル、3-または5-(1, 2, 4-チアジアゾリル)、1, 3, 4-チアジアゾリル、4-または5-(1, 2, 3-チアジアゾリル)、1, 2, 5-チアジアゾリル、1, 2, 3-トリアゾリル、1, 2, 4-トリアゾリル、1H-または2H-テトラゾリルなどの1ないし4個程度の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子、窒素原子などから選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む5員の芳香族複素環基、例えばN-オキシド-2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-ピリミジニル、N-オキシド-2-, 4-または5-ピリミジニル、チオモルホリニル、モルホリニル、オキソイミダジニル、ジオキソトリアジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピラニル、チオピラニル、1, 4-オキサジニル、1, 4-チアジニル、1, 3-チアジニル、ピペラジニル、トリアジニル、オキソトリアジニル、3-または4-ピリダジニル、ピラジニル、N-オキシド-3-または4-ピリダジニルなどの2ないし5個程度の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子、窒素原子などから選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む6員の芳香族複素環基、例えばベンゾフリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、テトラゾロ〔1, 5-b〕ピリダジニル、トリアゾロ〔4, 5-b〕ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、1, 8-ナフチリジニル、プリニル、プテリジニル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナントリジニル、クロマニル、ベンゾオキサジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニルなどの1ないし8個程度の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子、窒素原子などから選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む5ないし9員の芳香族複素環基などが挙げられる。該芳香族複素環基が有していてもよい置換基としては、例えばC₁₋₆アルキル (例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチルなど)、C₂₋₆アルケニル (例、ビニル、1-メチルビニル、1-プロベニル、アリルなど)、C₂₋₆アルキニル (例、エチニル、1-プロビニル、プロパルギルなど)、C₃₋₆シクロアルキル (例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど)、C₆₋₇

シクロアルケニル (例、シクロペンテニル、シクロヘキセニルなど)、C₇₋₁₁ アラルキル (例、ベンジル、 α -メチルベンジル、フェネチルなど)、C₆₋₁₄ アリール (例、フェニル、ナフチルなど)、C₁₋₆ アルコキシ (例、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、iso-プロポキシ、n-ブトキシ、iso-ブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシなど)、C₆₋₁₄ アリールオキシ (例、フェノキシなど)、C₁₋₆ アルキルカルボニル (例、ホルミル、アセチル、プロピオニル、n-ブチリル、iso-ブチリルなど)、C₆₋₁₄ アリール-カルボニル (例、ベンゾイルなど)、C₁₋₆ アルカノイルオキシ (例、ホルミルオキシ、アセチルオキシ、プロピオニルオキシ、n-ブチリルオキシ、iso-ブチリルオキシなど)、C₆₋₁₄ アリール-カルボニルオキシ (例、ベンゾイルオキシなど)、カルボキシル、C₁₋₆ アルコキシ-カルボニル (例、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、n-プロポキシカルボニル、iso-プロポキシカルボニル、n-ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニルなど)、カルバモイル基、N-モノ-C₁₋₄ アルキルカルバモイル (例、N-メチルカルバモイル、N-エチルカルバモイル、N-プロピルカルバモイル、N-イソプロピルカルバモイル、N-ブチルカルバモイルなど)、N,N-ジ-C₁₋₄ アルキルカルバモイル (例、N,N-ジメチルカルバモイル、N,N-ジエチルカルバモイル、N,N-ジプロピルカルバモイル、N,N-ジブチルカルバモイルなど)、ハロゲン原子 (例、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲノ-C₁₋₄ アルキル (例、クロロメチル、ジクロロメチル、トリフルオロメチル、トリフルオロエチルなど)、オキシ基、アミノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-又はジ-C₁₋₄ アルキルアミノ基 (例、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、ブチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ、ジイソプロピルアミノ、ジブチルアミノなど)、OH基、ニトロ基などが挙げられる。置換の数は1ないし6個程度、好ましくは1ないし3個程度である。X¹としては、例えばOH基、SH基、メチル基、エチル基、n-プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀ アルコキシフェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀ アルキルフェニル基、メトキシ、エトキシなどが好ましい。特に、OH基、SH基、メチル基、フェニル基などが好適である。

【0128】本明細書において、QはY (Yは糖残基を示す。) または式

【0129】

【化77】



【0130】〔式中、Yは糖残基を示す。〕で表される基を示す。Yで表される糖残基としては、前記のものと同様のものが用いられる。本明細書において、B¹、B²、B²¹、B²²およびB³は、それぞれ核酸残基を示す。該核酸残基としては、例えばヒポキサンチン-9-イル、グアニン-9-イル、アデニン-9-イル、ウラシル-1-イル、チミン-1-イル、シトシン-1-イルなどが用いられる。B²はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよい。B¹、B²、B²¹、B²²およびB³は、製造するオリゴヌクレオチド配列に応じて、適当に選択することができる。X²、X³、X⁶、X⁷およびX⁸はそれぞれOH基、SH基、C₁₋₆ アルキル基、C₁₋₆ アルコキシ基、C₁₋₆ モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、X⁴、X⁵、X⁸はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよい。X⁴およびX⁵はそれぞれOH基、SH基、C₁₋₆ アルキル基、C₁₋₆ アルコキシ基またはC₁₋₆ モノアルキルアミノ基を示し、X⁶はnの繰返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよい。X²、X³、X⁴、X⁵、X⁶、X⁷およびX⁸で表されるC₁₋₆ アルキル基としては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、i-ブチル、tert-ブチルなどが用いられる。X²、X³、X⁴、X⁵、X⁶、X⁷およびX⁸で表されるC₁₋₆ アルコキシ基としては、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシなどが用いられる。X²、X³、X⁴、X⁵、X⁶、X⁷およびX⁸で表されるC₁₋₆ モノアルキルアミノ基としては、メチルアミノ、エチルアミノ、n-プロピルアミノなどが用いられる。該置換されていてもよいフェニル基の置換基としては、例えばハロゲン原子 (例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、C₁₋₁₀ アルキルカルボニル基 (例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなどのC₁₋₆ アルキルカルボニル基)、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀ アルキル基 (例えば、メチル、エチルなど)、C₁₋₁₀ アルコキシ基 (例えば、メトキシ、エトキシ、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、i-ブチル、tert-ブチルなど)、フェニル基、ナフチル基などが用いられ、置換基の数は通常1ないし5個程度、好ましくは1ないし3個程度である。X²、X³、X⁶、X⁷およびX⁸で表される置換されていてもよい芳香環基の芳香環基としては、例えばアリール基、芳香族複素環基などが用いられる。該アリール基としては、例えばC₆₋₁₁ アリール基 (例えば、フェニル基、ナフチル基など) などが用いられ、特にフェニル基が好適である。該アリール基の置換基としては、例えばハロゲン原子 (例、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、C₁₋₁₀ アルキルカルボニル基 (例、ホルミル、アセチル、プロピオニル、n-ブチリル、iso-ブチリルなど)、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀ アルキル基 (例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、se

61

c-ブチル、tert-ブチルなど)、C₁₋₁₀アルコキシ基(例、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、iso-プロポキシ、n-ブトキシ、iso-ブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシなど)、フェニル基、ナフチル基などが挙げられる。置換基の数は1ないし5個程度、好ましくは1ないし3個程度である。該芳香族複素環基としては、例えば窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子とを含有する5ないし13員の芳香族複素環基などが用いられ、特に5ないし9員の芳香族複素環基などが好適である。例えば2-または3-チエニル、2-または3-フリル、2-または3-ピロリル、2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-オキサゾリル、2-, 4-または5-チアゾリル、3-, 4-または5-ピラゾリル、2-, 4-または5-イミダゾリル、3-, 4-または5-イソオキサゾリル、3-, 4-または5-イソチアゾリル、3-または5-(1, 2, 4-オキサジアゾリル)、1, 3, 4-オキサジアゾリル、3-または5-(1, 2, 4-チアジアゾリル)、1, 3, 4-チアジアゾリル、4-または5-(1, 2, 3-チアジアゾリル)、1, 2, 5-チアジアゾリル、1, 2, 3-トリアゾリル、1, 2, 4-トリアゾリル、1 H-または2 H-テトラゾリルなどの1ないし4個程度の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子、窒素原子などから選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む5員の芳香族複素環基、例えばN-オキシド-2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-ピリミジニル、N-オキシド-2-, 4-または5-ピリミジニル、チオモルホリニル、モルホリニル、オキソイミダジニル、ジオキソトリアジニル、ピロリジニル、ピベリジニル、ピラニル、チオピラニル、1, 4-オキサジニル、1, 4-チアジニル、1, 3-チアジニル、ピベラジニル、トリアジニル、オキソトリアジニル、3-または4-ピリダジニル、ピラジニル、N-オキシド-3-または4-ピリダジニルなどの2ないし5個程度の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子、窒素原子などから選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む6員の芳香族複素環基、例えばベンゾフリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、テトラゾロ〔1, 5-b〕ピリダジニル、トリアゾロ〔4, 5-b〕ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、1, 8-ナフチリジニル、プリニル、プテリジニル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナントリジニル、クロマニル、ベンゾオキサジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニルなどの1ないし8個程度の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子、窒素原子などから選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む5ないし9員の芳香族複素環基などが挙げられる。該芳香族複素環基が有していてもよい置換基と

62

しては、例えばC₁₋₆アルキル(例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチルなど)、C₂₋₆アルケニル(例、ビニル、1-メチルビニル、1-プロペニル、アリルなど)、C₂₋₆アルキニル(例、エチニル、1-プロピニル、プロパルギルなど)、C₃₋₆シクロアルキル(例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど)、C₆₋₇シクロアルケニル(例、シクロペンテニル、シクロヘキセニルなど)、C₇₋₁₁アラルキル(例、ベンジル、 α -メチルベンジル、フェネチルなど)、C₆₋₁₄アリール(例、フェニル、ナフチルなど)、C₁₋₆アルコキシ(例、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、iso-プロポキシ、n-ブトキシ、iso-ブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシなど)、C₆₋₁₄アリールオキシ(例、フェノキシなど)、C₁₋₆アルキルカルボニル(例、ホルミル、アセチル、プロピオニル、n-ブチリル、iso-ブチリルなど)、C₆₋₁₄アリール-カルボニル(例、ベンゾイルなど)、C₁₋₆アルカノイルオキシ(例、ホルミルオキシ、アセチルオキシ、プロピオニルオキシ、n-ブチリルオキシ、iso-ブチリルオキシなど)、C₆₋₁₄アリール-カルボニルオキシ(例、ベンゾイルオキシなど)、カルボキシル、C₁₋₆アルコキシ-カルボニル(例、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、n-プロポキシカルボニル、iso-プロポキシカルボニル、n-ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニルなど)、カルバモイル基、N-モノ-C₁₋₄アルキルカルバモイル(例、N-メチルカルバモイル、N-エチルカルバモイル、N-プロピルカルバモイル、N-イソプロピルカルバモイル、N-ブチルカルバモイルなど)、N, N-ジ-C₁₋₄アルキルカルバモイル(例、N, N-ジメチルカルバモイル、N, N-ジエチルカルバモイル、N, N-ジプロピルカルバモイル、N, N-ジブチルカルバモイルなど)、ハロゲン原子(例、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなど)、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲン-C₁₋₄アルキル(例、クロロメチル、ジクロロメチル、トリフルオロメチル、トリフルオロエチルなど)、オキソ基、アミジノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-又はジ-C₁₋₄アルキルアミノ基(例、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、ブチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ、ジイソプロピルアミノ、ジブチルアミノなど)、OH基、ニトロ基などが挙げられる。置換の数は1ないし6個程度、好ましくは1ないし3個程度である。X²、X³、X⁶、X⁷およびX⁸としては、例えばOH基、SH基、メチル基、エチル基、n-プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルコキシフェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルキルフェニル基、メトキシ、エトキシなどが好ましい。特に、OH基、SH基、メチル基、フェニル基などが好適である。X⁴およびX⁵としては、例えばOH基、SH基、メチル

63

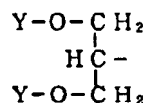
基、エチル基、*n*-プロピル基、メトキシ基、エトキシ基などが好ましい。特に、OH基、SH基、メチル基などが好適である。

【0131】本明細書において、 R^1 、 R^2 、 R^{21} 、 R^{22} および R^3 は、それぞれ水素原子、OH、ハロゲン原子、 C_{1-6} アルコキシル基、 C_{1-6} アルコキシアルキルオキシ基を示し、 R^2 および R^{21} は n の繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なっている。該ハロゲン原子としては、例えばフルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなどが用いられる。該 C_{1-6} アルコキシル基としては、例えばメトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、*i*-プロポキシ、*n*-ブトキシなどが用いられる。該 C_{1-6} アルコキシアルキルオキシ基としては、例えばメトキシメチルオキシ、メトキシエチルオキシ、メトキシプロピルオキシ、エトキシメチルオキシ、エトキシエチルオキシ、エトキシプロピルオキシなどの C_{1-6} アルコキシ- C_{1-6} アルキル-オキシなどが用いられる。 R^1 、 R^2 、 R^{21} 、 R^{22} および R^3 としては、それぞれ水素原子、OH、ハロゲン原子、メトキシ基、エトキシ基、メトキシメチルオキシ基などが好ましく、特に水素原子が好適である。 n は1~98の整数を示す。なかでも、1~38の整数、より好ましくは1~28の整数、特に5~18の整数が好ましい。すなわち、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体としては、通常3ないし100個程度、好ましくは3ないし40個程度、より好ましくは3ないし30個程度、特に好ましくは7ないし20個程度のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチド誘導体である。

【0132】以後、本明細書において、オリゴヌクレオチド鎖部分を表記する場合、例えばオリゴヌクレオチド誘導体(Ia)において、 B^1 、 B^2 および B^3 がチミン-1-イルで、 R^1 、 R^2 および R^3 が水素原子で、 n が1であるオリゴヌクレオチド鎖TTTを表記する場合、 X^1 、 X^2 および X^3 がOH基の場合は単にTTTと表記し、 X^1 がOH基で X^2 および X^3 がSH基の場合は T_sT_sT と表記し、 X^1 がOH基で X^2 および X^3 がメチル基の場合は T_MT_MT と表記し、 X^1 がOH基で X^2 および X^3 がフェニル基の場合は T_FT_FT と表記し、 X^1 がOH基で X^2 がSH基で X^3 がフェニル基の場合は T_sT_FT と表記する場合がある。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体(Ia)において、Qとしては、例えばYまたは式

【0133】

【化78】



【0134】で表される基などが好ましい。QがYの場合、Yで示される糖残基の糖としては、例えば C_{1-10} アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなどの C_{1-6} アルキルカルボニル基)、

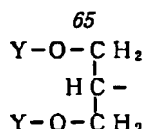
64

フェニルカルボニル基などのアシル基や C_{1-20} アルキル基(例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*n*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチルなど)などで置換されていてもよい単糖類、オリゴ糖またはグリコシド誘導体などが好ましい。該単糖類としては、例えば5炭糖アルドース(例えば、リボース、アラビノースなど)、6炭糖アルドース(例えば、グルコース、マンノース、ガラクトースなど)などが好ましく、特にガラクトース、マンノース、ガラクトサミンなどが好ましい。該オリゴ糖としては、メリビオース、ゲンチオビオース、イソマルトトリオースなどが好ましい。該グリコシド誘導体としては、*n*-オクチルグルコシド、*n*-オクチルチオグルコシド、フェニルグルコシドなどが好ましい。また、 C_{1-6} アルキルカルボニル基またはフェニルカルボニル基で2-アミノ基が置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミンなども好ましい。これらのなかでも、①水酸基が C_{1-6} アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなど)などで置換されていてもよいガラクトースまたはマンノース、②水酸基がフェニルカルボニル基で置換されていてもよいメリビオース、ゲンチオビオースまたはイソマルトトリオース、③*n*-オクチルグルコシド、*n*-オクチルチオグルコシドまたはフェニルグルコシド、④ C_{1-10} アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなどの C_{1-6} アルキルカルボニル基)またはフェニルカルボニル基で置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミンなどが好適である。具体的には、例えばGal(ガラクトース)、Man(マンノース)、*n*-oct-Glc(*n*-オクチルグルコシド)、*n*-oct-SGlc(*n*-オクチルチオグルコシド)、PhGlc(フェニルグルコシド)、PhGal(フェニルガラクトシド)、GalN(ガラクトサミン)、N-AcGal(N-アセチルガラクトサミン)、N-BzGal(N-ベンゾイルガラクトサミン)、GulN(グルコサミン)、N-AcGul(N-アセチルグルコサミン)、Mel(メリビオース)、Gen(ゲンチオビオース)、Iso(イソマルトトリオース)などが好ましい。また、水酸基が C_{1-6} アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなど)などで置換されていてもよい6炭糖アルドースなども好ましく、具体的には、例えばガラクトース、マンノース、1,2,3,4-0-テトラアセチルガラクトース、1,2,3,4-0-テトラアセチルマンノース、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、N-ベンゾイルグルコサミン、N-ベンゾイルガラクトサミンなどが好適である。

【0135】Qが式

【0136】

【化79】



【0137】で表される基の場合、Yで示される糖残基の糖としては、例えば単糖類などが好ましい。該単糖類としては、例えばガラクトース、マンノース、グルコースなどが好ましく、特にガラクトースが好適である。X¹としては、①OH基、②SH基、③C₁₋₅アルキル基、④C₁₋₅アルコキシ基、⑤C₁₋₅モノアルキルアミノ基、⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₆₋₁₁アリール基（例えば、フェニル基、ナフチル基など）、または⑦C₁₋₅アルキル基、C₂₋₆アルケニル基、C₂₋₆アルキニル基、C₃₋₆シクロアルキル基、C₅₋₇シクロアルケニル基、C₇₋₁₁アラルキル基、C₆₋₁₄アリール基、C₁₋₆アルコキシ基、C₆₋₁₄アリールオキシ基、C₁₋₆アルキルカルボニル基、C₆₋₁₄アリールカルボニル基、C₁₋₆アルカノイルオキシ基、C₆₋₁₄アリールカルボニルオキシ基、カルボキシル基、C₁₋₆アルコキシカルボニル基、カルバモイル基、N-モノ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、N,N-ジ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、ハロゲン原子、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲン-C₁₋₄アルキル基、オキソ基、アミジノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-又はジC₁₋₄アルキルアミノ基、OH基およびニトロ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環基などが好ましい。窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環基としては、2-または3-チエニル、2-または3-フリル、2-または3-ピロリル、2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-オキサゾリル、2-, 4-または5-チアゾリル、3-, 4-または5-ピラゾリル、2-, 4-または5-イミダゾリル、3-, 4-または5-イソオキサゾリル、3-, 4-または5-イソチアゾリル、3-または5-(1, 2, 4-オキサジアゾリル)、1, 3, 4-オキサジアゾリル、3-または5-(1, 2, 4-チアジアゾリル)、1, 3, 4-チアジアゾリル、4-または5-(1, 2, 3-チアジアゾリル)、1, 2, 5-チアジアゾリル、1, 2, 3-トリアゾリル、1, 2, 4-トリアゾリル、1H-または2H-テトラゾリル、N-オキシド-2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-ピリミジニル、N-オキシド-2-, 4-または5-ピリミジニル、チ

66

オモルホリニル、モルホリニル、オキソイミダジニル、ジオキソトリアジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピラニル、チオピラニル、1, 4-オキサジニル、1, 4-チアジニル、1, 3-チアジニル、ピペラジニル、トリアジニル、オキソトリアジニル、3-または4-ピリダジニル、ピラジニル、N-オキシド-3-または4-ピリダジニル、ベンゾフリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、テトラゾロ〔1, 5-b〕ピリダジニル、トリアゾロ〔4, 5-b〕ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フトラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、1, 8-ナフチリジニル、ブリニル、プテリジニル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナントリジニル、クロマニル、ベンゾオキサジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニルなどが好ましい。X¹としては、特にOH基、SH基、メチル基、エチル基、n-プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルコキシフェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルキルフェニル基、メトキシ、エトキシなどが好ましい。なかでも、OH基、SH基、メチル基、フェニル基などが好適である。X⁴およびX⁵としては、例えば OH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基などが好ましい。なかでも、OH基、SH基、メチル基、エチル基、n-プロピル基、メトキシ、エトキシなどが好ましく、特にOH基、SH基、メチル基などが好適である。

【0138】X¹、X⁴およびX⁵の組み合わせとしては、

(i) X¹が①OH基、②SH基、③C₁₋₅アルキル基、④C₁₋₅アルコキシ基、⑤C₁₋₅モノアルキルアミノ基、または⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいフェニル基であり、X⁴およびX⁵がそれぞれOH基、SH基、C₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基またはC₁₋₅モノアルキルアミノ基である場合、

(ii) X¹がOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-アルコキシフェニル基、(o, m, p)-アルキルフェニル基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選ばれたものであり、X⁴およびX⁵がそれぞれOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、メトキシ基またはエトキシ基である場合、

(iii) X¹がOH基、SH基、メチル基、エチル基、プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルコキシフェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルキルフェニル基、メトキシ基またはエトキシ基であり、X⁴およびX⁵がそれぞれOH基、SH基、メチル基、エチル

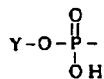
67

基、プロピル基、メトキシ基、エトキシ基である場合、

(iv) X¹がOH基、SH基、メチル基またはフェニル基であり、X⁴およびX⁵がそれぞれOH基、SH基またはメチル基である場合、などが好適である。B¹、B²およびB³で表される核酸残基としては、ヒポキサンチン-9-イル、グアニン-9-イル、アデニン-9-イル、ウラシル-1-イル、チミン-1-イル、シトシン-1-イルなどが好ましく、製造するオリゴヌクレオチド配列に応じて、適当に選択することができる。R¹、R²およびR³としては、それぞれ水素原子、OH、ハロゲン原子、メトキシ基、エトキシ基、メトキシメチルオキシ基などが好ましく、特に水素原子が好適である。nは1~98の整数を示す。なかでも、1~38の整数、より好ましくは1~28の整数、特に5~18の整数が好ましい。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体(Ia)としては、上記した各記号の好ましいものを、適宜組み合わせた何れの誘導体も好ましい。なかでも、CATで表されるヌクレオチド配列を含有するオリゴヌクレオチド誘導体などが好ましい。また、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体(Ia)は、いわゆるアンチセンス・オリゴヌクレオチド誘導体である場合がより好ましい。さらに、リボソーム(例えば、リボフェクチンばど)で包括されていることが好ましい。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体(Ib)において、Wとしては、例えば水素原子、式

【0139】

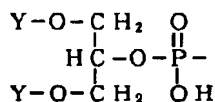
【化80】



【0140】で表される基、式

【0141】

【化81】

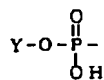


【0142】で表される基などが好ましい。

【0143】Wが式

【0144】

【化82】



【0145】で表される基の場合、Yで示される糖残基の糖としては、例えばC₁₋₁₀アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなどのC₁₋₆アルキルカルボニル基)、フェニルカルボニル基などのアシル基やC₁₋₂₀アルキル基(例えば、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、n-

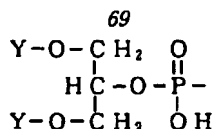
68

ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルなど)などで置換されていてもよい単糖類、オリゴ糖またはグリコシド誘導体などが好ましい。該単糖類としては、例えば5炭糖アルドース(例えば、リボース、アラビノースなど)、6炭糖アルドース(例えば、グルコース、マンノース、ガラクトースなど)などが好ましく、特にガラクトース、マンノース、ガラクトサミンなどが好ましい。該オリゴ糖としては、メリビオース、ゲンチオビオース、イソマルトトリオースなどが好ましい。該グリコシド誘導体としては、n-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシド、フェニルグルコシドなどが好ましい。また、C₁₋₆アルキルカルボニル基またはフェニルカルボニル基で2-アミノ基が置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミンなども好ましい。これらのなかでも、①水酸基がC₁₋₆アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなど)などで置換されていてもよいガラクトースまたはマンノース、②水酸基がフェニルカルボニル基で置換されていてもよいメリビオース、ゲンチオビオースまたはイソマルトトリオース、③n-オクチルグルコシド、n-オクチルチオグルコシドまたはフェニルグルコシド、④C₁₋₁₀アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなどのC₁₋₆アルキルカルボニル基)またはフェニルカルボニル基で置換されていてもよいグルコサミンまたはガラクトサミンなどが好適である。具体的には、例えばGal(ガラクトース)、Man(マンノース)、n-oct-Glc(n-オクチルグルコシド)、n-oct-SGlc(n-オクチルチオグルコシド)、PhGlc(フェニルグルコシド)、PhGal(フェニルガラクトシド)、GalN(ガラクトサミン)、N-AcGal(N-アセチルガラクトサミン)、N-BzGal(N-ベンゾイルガラクトサミン)、GulN(グルコサミン)、N-AcGul(N-アセチルグルコサミン)、Mel(メリビオース)、Gen(ゲンチオビオース)、Iso(イソマルトトリオース)などが好ましい。なかでも、Mel(メリビオース)、Gen(ゲンチオビオース)、N-BzGal(N-ベンゾイルガラクトサミン)などが好適である。また、水酸基がC₁₋₆アルキルカルボニル基(例えば、ホルミル、アセチル、エチルカルボニルなど)などで置換されていてもよい6炭糖アルドースなども好ましく、具体的には、例えばガラクトース、マンノース、1,2,3,4-0-テトラアセチルガラクトース、1,2,3,4-0-テトラアセチルマンノース、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、N-ベンゾイルグルコサミン、N-ベンゾイルガラクトサミンなどが好適である。

【0146】Wが式

【0147】

【化83】



【0148】で表される基の場合、Yで示される糖残基の糖としては、例えば単糖類などが好ましい。該単糖類としては、例えばガラクトース、マンノース、グルコースなどが好ましく、特にガラクトースが好適である。X⁶およびX⁷としては、それぞれ①OH基、②SH基、③C₁₋₅アルキル基、④C₁₋₅アルコキシ基、⑤C₁₋₅モノアルキルアミノ基、⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₆₋₁₁アリール基（例えば、フェニル基、ナフチル基など）、または⑦C₁₋₆アルキル基、C₂₋₆アルケニル基、C₂₋₆アルキニル基、C₃₋₆シクロアルキル基、C₅₋₇シクロアルケニル基、C₇₋₁₁アラルキル基、C₆₋₁₄アリール基、C₁₋₆アルコキシ基、C₆₋₁₄アリールオキシ基、C₁₋₆アルキルカルボニル基、C₆₋₁₄アリールカルボニル基、C₁₋₆アルカノイルオキシ基、C₆₋₁₄アリールカルボニルオキシ基、カルボキシ基、C₁₋₆アルコキシカルボニル基、カルバモイル基、N-モノ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、N,N-ジ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、ハロゲン原子、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲン-C₁₋₄アルキル基、オキソ基、アミジノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-又はジ-C₁₋₄アルキルアミノ基、OH基およびニトロ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環基などが好ましい。

【0149】窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環基としては、2-または3-チエニル、2-または3-フリル、2-または3-ピロリル、2-、3-または4-ピリジル、2-、4-または5-オキサゾリル、3-、4-または5-チアゾリル、3-、4-または5-イミダゾリル、3-、4-または5-イソオキサゾリル、3-、4-または5-イソチアゾリル、3-または5-(1,2,4-オキサジアゾリル)、1,3,4-オキサジアゾリル、3-または5-(1,2,4-チアジアゾリル)、1,3,4-チアジアゾリル、4-または5-(1,2,3-チアジアゾリル)、1,2,5-チアジアゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1H-または2H-テトラゾリル、N-オキシド-2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-ピリミジニル、

10

20

30

40

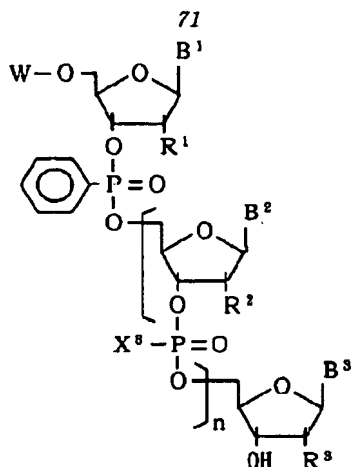
50

N-オキシド-2-, 4-または5-ピリミジニル、チオモルホリニル、モルホリニル、オキソイミダジニル、ジオキソトリアジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピラニル、チオピラニル、1, 4-オキサジニル、1, 4-チアジニル、1, 3-チアジニル、ピペラジニル、トリアジニル、オキソトリアジニル、3-または4-ピリダジニル、ピラジニル、N-オキシド-3-または4-ピリダジニル、ベンゾフリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、テトラゾロ〔1, 5-b〕ピリダジニル、トリアゾロ〔4, 5-b〕ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、1, 8-ナフチリジニル、ブリニル、プテリジニル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナントリジニル、クロマニル、ベンゾオキサジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニルなどが好ましい。X⁶およびX⁷としては、それぞれ①OH基、②SH基、③C₁₋₅アルキル基、④C₁₋₅アルコキシ基、⑤C₁₋₆モノアルキルアミノ基、または⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいフェニル基などが好ましく、なかでもOH基、SH基、メチル基、エチル基、n-プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルコキシフェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルキルフェニル基、メトキシ基、エトキシ基などが好ましい。特に、OH基、SH基、メチル基、フェニル基などが好適である。B¹、B²、B²¹、B²²およびB³で表される核酸残基としては、ヒポキサンチン-9-イル、グアニン-9-イル、アデニン-9-イル、ウラシル-1-イル、チミン-1-イル、シトシン-1-イルなどが好ましく、製造するオリゴヌクレオチド配列に応じて、適当に選択することができる。R¹、R²、R²¹、R²²およびR³としては、それぞれ水素原子、OH、ハロゲン原子、メトキシ基、エトキシ基、メトキシメチルオキシ基などが好ましく、特に水素原子が好適である。nは1~98の整数を示す。なかでも、1~38の整数、より好ましくは1~28の整数、特に5~18の整数が好ましい。

【0150】本発明のオリゴヌクレオチド誘導体(1b)のなかでも、特に5'-末端にフェニルホスホネートタイプのヌクレオチドを含有するものが好ましい。すなわち、式

【0 1 5 1】

【化 8 4】



【0152】で表されるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド誘導体(1b-1)が好適である。W、B¹、B²、B³、R¹、R²、R³およびnの好ましい範囲としては、オリゴヌクレオチド誘導体(1b)の好ましい範囲として前記したものと同様のものが挙げられる。X⁸としては、①OH基、②SH基、③C₁₋₆アルキル基、④C₁₋₆アルコキシ基、⑤C₁₋₆モノアルキルアミノ基、⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいC₆₋₁₁アリール基(例えば、フェニル基、ナフチル基など)、または⑦C₁₋₆アルキル基、C₂₋₆アルケニル基、C₂₋₆アルキニル基、C₃₋₆シクロアルキル基、C₅₋₇シクロアルケニル基、C₇₋₁₁アラールキル基、C₆₋₁₄アリール基、C₁₋₆アルコキシ基、C₆₋₁₄アリールオキシ基、C₁₋₆アルキルカルボニル基、C₆₋₁₄アリールカルボニル基、C₁₋₆アルカノイルオキシ基、C₆₋₁₄アリールカルボニルオキシ基、カルボキシル基、C₁₋₆アルコキシカルボニル基、カルバモイル基、N-モノ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、N,N-ジ-C₁₋₄アルキルカルバモイル基、ハロゲン原子、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲン-C₁₋₄アルキル基、オキソ基、アミノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-又はジ-C₁₋₄アルキルアミノ基、OH基およびニトロ基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよい窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環基などが好ましい。窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれる1ないし4個程度のヘテロ原子と1ないし12個程度の炭素原子を含有する5ないし13員の芳香複素環基としては、2-または3-チエニル、2-または3-フリル、2-または3-ピロリル、2-、3-または4-ピリジル、2-、4-または5-オキサゾリル、2-、4-または5-チアゾリル、3-、4-ま

72

たは5-ピラゾリル、2-、4-または5-イミダゾリル、3-、4-または5-イソオキサゾリル、3-、4-または5-イソチアゾリル、3-または5-(1,2,4-オキサジアゾリル)、1,3,4-オキサジアゾリル、3-または5-(1,2,4-チアジアゾリル)、1,3,4-チアジアゾリル、4-または5-(1,2,3-チアジアゾリル)、1,2,5-チアジアゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1H-または2H-テトラゾリル、N-オキシド-2-、3-または4-ピリジル、2-、4-または5-ピリミジニル、N-オキシド-2-、4-または5-ピリミジニル、チオモルホリニル、モルホリニル、オキソイミダジニル、ジオキソトリアジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピラニル、チオピラニル、1,4-オキサジニル、1,4-チアジニル、1,3-チアジニル、ヒペラジニル、トリアジニル、オキソトリアジニル、3-または4-ピリダジニル、ピラジニル、N-オキシド-3-または4-ピリダジニル、ベンゾフリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、テトラゾロ〔1,5-b〕ピリダジニル、トリアゾロ〔4,5-b〕ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、1,8-ナフチリジニル、プリニル、プテリジニル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナントリジニル、クロマニル、ベンゾオキサジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニルなどが好ましい。X⁸としては、特にOH基、SH基、メチル基、エチル基、n-プロピル基、フェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルコキシフェニル基、(o, m, p)-C₁₋₁₀アルキルフェニル基、メトキシ、エトキシなどが好ましい。なかでも、OH基、SH基、メチル基、フェニル基などが好適である。より好ましいオリゴヌクレオチド誘導体(1b)としては、5'-末端および3'-末端から2番目の位置にフェニルホスホネートタイプのヌクレオチドを含有するものが挙げられる。すなわち、式

【0153】

【化85】



20

30

40

【0 1 5 8】

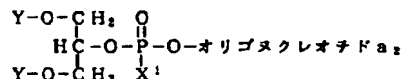
$$\text{Y}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{Y}_1}{\text{P}}}-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド a}_1$$

75

【0159】〔式中、YおよびX1は前記と同意義を示す。〕で表されるオリゴヌクレオチド誘導体 (I a-1)、

【0160】

【化87】



【0161】〔式中、YおよびX1は前記と同意義を示す。〕で表されるオリゴヌクレオチド誘導体 (I a-2) などが挙げられる。オリゴヌクレオチド誘導体 (I a-1) および (I a-2) におけるオリゴヌクレオチド a_1 およびオリゴヌクレオチド a_2 の例としては、例えば

TGGGAGCCATAGCGAGGC (配列番号: 1)
TGGGAGCCATAGCGAGGCT (配列番号: 2)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 3)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGG (配列番号: 4)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAG (配列番号: 5)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGA (配列番号: 6)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTG (配列番号: 7)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCT (配列番号: 8)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGC (配列番号: 9)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGG (配列番号: 10)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAG (配列番号: 11) *

Ts Gs Gs Gs As Cs Cs As Ts As Gs Cs Gs Gs Gs C
Ts Gs GGAGCCATAGCGAGG Gs C

などが挙げられる。特に、配列番号: 1、配列番号: 3、配列番号: 34などで表されるオリゴヌクレオチド a_1 およびオリゴヌクレオチド a_2 が好適である。

【0162】オリゴヌクレオチド誘導体 (I a-1) におけるYとしては、具体的にはGal (ガラクトース)、Man (マンノース)、n-oct-Glc (n-オクタリルグルコシド)、n-oct-SGlc (n-オクタリルチオグルコシド)、PhGlc (フェニルグルコシド)、PhGal (フェニルガラクトシド)、GalN (ガラクトサミン)、N-AcGal (N-アセチルガラクトサミン)、N-BzGal (N-ベンゾイルガラクトサミン)、GuIN (グルコサミン)、N-AcGuI (N-アセチルグルコサミン)、Mel (メリピオース)、Gen (ゲンチオピオース)、Iso (イソマルトリオース) などが好ましい。オリゴヌクレオチド誘導体 (I a-2) におけるYとしては、具体的にはGal (ガラクトース)、Man (マンノース)、Glu (グルコース) などが好ましく、特にGal (ガラクトース) が好適である。また、炎症を引き起こす原因となる接着タンパク質を産生する遺伝子であるICAM-1に相補的なオリゴヌクレオチド誘導体 (I b) としては、例えば式

【0163】

76

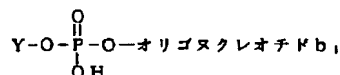
* GGCTGCTGGGAGCCATAGCGA (配列番号: 12)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCG (配列番号: 13)
GGCTGCTGGGAGCCATAGC (配列番号: 14)
GGCTGCTGGGAGCCATAG (配列番号: 15)
GGCTGCTGGGAGCCATA (配列番号: 16)
GGCTGCTGGGAGCCAT (配列番号: 17)
GCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 18)
CTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 19)
TGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 20)
GCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 21)
CTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 22)
TGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 23)
GGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 24)
GGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 25)
GAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 26)
AGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 27)
GCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 28)
CCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 29)
CATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 30)

などが挙げられる。これらのオリゴヌクレオチドにおけるX¹、X⁴およびX⁵はOH基であるが、X⁴および(または)X⁵がSH基またはメチル基などであってもよい。このようなオリゴヌクレオチド a_1 およびオリゴヌクレオチド a_2 としては、例えば、

(配列番号: 31)

(配列番号: 34)

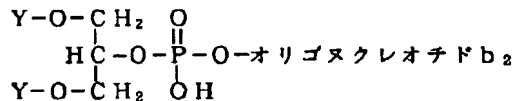
【化88】



【0164】〔式中、Yは前記と同意義を示す。〕で表されるオリゴヌクレオチド誘導体 (I b-3)、式

【0165】

【化89】



【0166】〔式中、Yは前記と同意義を示す。〕で表されるオリゴヌクレオチド誘導体 (I b-4) などが挙げられる。オリゴヌクレオチド誘導体 (I b-3) および (I b-4) におけるオリゴヌクレオチド b_1 およびオリゴヌクレオチド b_2 の例としては、例えば

TGGGAGCCATAGCGAGGC (配列番号: 1)
TGGGAGCCATAGCGAGGCT (配列番号: 2)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 3)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGG (配列番号: 4)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAG (配列番号: 5)
GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGA (配列番号: 6)

77

GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTG (配列番号: 7)
 GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCT (配列番号: 8)
 GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGC (配列番号: 9)
 GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAGG (配列番号: 10)
 GGCTGCTGGGAGCCATAGCGAG (配列番号: 11)
 GGCTGCTGGGAGCCATAGCGA (配列番号: 12)
 GGCTGCTGGGAGCCATAGCG (配列番号: 13)
 GGCTGCTGGGAGCCATAGC (配列番号: 14)
 GGCTGCTGGGAGCCATAG (配列番号: 15)
 GGCTGCTGGGAGCCATA (配列番号: 16)
 GGCTGCTGGGAGCCAT (配列番号: 17)
 GCTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 18)
 CTGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 19)
 TGCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 20)
 GCTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 21)
 CTGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 22)
 TGGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 23)
 GGGAGCCATAGCGAGGCTGAGGT (配列番号: 24) *

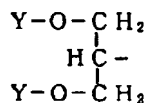
T₁ G₂ G₃ G₄ G₅ G₆ G₇ G₈ G₉ G₁₀ G₁₁ G₁₂ G₁₃ G₁₄ G₁₅ G₁₆ G₁₇ G₁₈ G₁₉ G₂₀ G₂₁ G₂₂ G₂₃ G₂₄ G₂₅ G₂₆ G₂₇ G₂₈ G₂₉ G₃₀ G₃₁ G₃₂ G₃₃ G₃₄ G₃₅ G₃₆ G₃₇ G₃₈ G₃₉ G₄₀ G₄₁ G₄₂ G₄₃ G₄₄ G₄₅ G₄₆ G₄₇ G₄₈ G₄₉ G₅₀ G₅₁ G₅₂ G₅₃ G₅₄ G₅₅ G₅₆ G₅₇ G₅₈ G₅₉ G₆₀ G₆₁ G₆₂ G₆₃ G₆₄ G₆₅ G₆₆ G₆₇ G₆₈ G₆₉ G₇₀ G₇₁ G₇₂ G₇₃ G₇₄ G₇₅ G₇₆ G₇₇ G₇₈ G₇₉ G₈₀ G₈₁ G₈₂ G₈₃ G₈₄ G₈₅ G₈₆ G₈₇ G₈₈ G₈₉ G₉₀ G₉₁ G₉₂ G₉₃ G₉₄ G₉₅ G₉₆ G₉₇ G₉₈ G₉₉ G₁₀₀ G₁₀₁ G₁₀₂ G₁₀₃ G₁₀₄ G₁₀₅ G₁₀₆ G₁₀₇ G₁₀₈ G₁₀₉ G₁₁₀ G₁₁₁ G₁₁₂ G₁₁₃ G₁₁₄ G₁₁₅ G₁₁₆ G₁₁₇ G₁₁₈ G₁₁₉ G₁₂₀ G₁₂₁ G₁₂₂ G₁₂₃ G₁₂₄ G₁₂₅ G₁₂₆ G₁₂₇ G₁₂₈ G₁₂₉ G₁₃₀ G₁₃₁ G₁₃₂ G₁₃₃ G₁₃₄ G₁₃₅ G₁₃₆ G₁₃₇ G₁₃₈ G₁₃₉ G₁₄₀ G₁₄₁ G₁₄₂ G₁₄₃ G₁₄₄ G₁₄₅ G₁₄₆ G₁₄₇ G₁₄₈ G₁₄₉ G₁₅₀ G₁₅₁ G₁₅₂ G₁₅₃ G₁₅₄ G₁₅₅ G₁₅₆ G₁₅₇ G₁₅₈ G₁₅₉ G₁₆₀ G₁₆₁ G₁₆₂ G₁₆₃ G₁₆₄ G₁₆₅ G₁₆₆ G₁₆₇ G₁₆₈ G₁₆₉ G₁₇₀ G₁₇₁ G₁₇₂ G₁₇₃ G₁₇₄ G₁₇₅ G₁₇₆ G₁₇₇ G₁₇₈ G₁₇₉ G₁₈₀ G₁₈₁ G₁₈₂ G₁₈₃ G₁₈₄ G₁₈₅ G₁₈₆ G₁₈₇ G₁₈₈ G₁₈₉ G₁₉₀ G₁₉₁ G₁₉₂ G₁₉₃ G₁₉₄ G₁₉₅ G₁₉₆ G₁₉₇ G₁₉₈ G₁₉₉ G₂₀₀ G₂₀₁ G₂₀₂ G₂₀₃ G₂₀₄ G₂₀₅ G₂₀₆ G₂₀₇ G₂₀₈ G₂₀₉ G₂₁₀ G₂₁₁ G₂₁₂ G₂₁₃ G₂₁₄ G₂₁₅ G₂₁₆ G₂₁₇ G₂₁₈ G₂₁₉ G₂₂₀ G₂₂₁ G₂₂₂ G₂₂₃ G₂₂₄ G₂₂₅ G₂₂₆ G₂₂₇ G₂₂₈ G₂₂₉ G₂₃₀ G₂₃₁ G₂₃₂ G₂₃₃ G₂₃₄ G₂₃₅ G₂₃₆ G₂₃₇ G₂₃₈ G₂₃₉ G₂₄₀ G₂₄₁ G₂₄₂ G₂₄₃ G₂₄₄ G₂₄₅ G₂₄₆ G₂₄₇ G₂₄₈ G₂₄₉ G₂₅₀ G₂₅₁ G₂₅₂ G₂₅₃ G₂₅₄ G₂₅₅ G₂₅₆ G₂₅₇ G₂₅₈ G₂₅₉ G₂₆₀ G₂₆₁ G₂₆₂ G₂₆₃ G₂₆₄ G₂₆₅ G₂₆₆ G₂₆₇ G₂₆₈ G₂₆₉ G₂₇₀ G₂₇₁ G₂₇₂ G₂₇₃ G₂₇₄ G₂₇₅ G₂₇₆ G₂₇₇ G₂₇₈ G₂₇₉ G₂₈₀ G₂₈₁ G₂₈₂ G₂₈₃ G₂₈₄ G₂₈₅ G₂₈₆ G₂₈₇ G₂₈₈ G₂₈₉ G₂₉₀ G₂₉₁ G₂₉₂ G₂₉₃ G₂₉₄ G₂₉₅ G₂₉₆ G₂₉₇ G₂₉₈ G₂₉₉ G₃₀₀ G₃₀₁ G₃₀₂ G₃₀₃ G₃₀₄ G₃₀₅ G₃₀₆ G₃₀₇ G₃₀₈ G₃₀₉ G₃₁₀ G₃₁₁ G₃₁₂ G₃₁₃ G₃₁₄ G₃₁₅ G₃₁₆ G₃₁₇ G₃₁₈ G₃₁₉ G₃₂₀ G₃₂₁ G₃₂₂ G₃₂₃ G₃₂₄ G₃₂₅ G₃₂₆ G₃₂₇ G₃₂₈ G₃₂₉ G₃₃₀ G₃₃₁ G₃₃₂ G₃₃₃ G₃₃₄ G₃₃₅ G₃₃₆ G₃₃₇ G₃₃₈ G₃₃₉ G₃₄₀ G₃₄₁ G₃₄₂ G₃₄₃ G₃₄₄ G₃₄₅ G₃₄₆ G₃₄₇ G₃₄₈ G₃₄₉ G₃₅₀ G₃₅₁ G₃₅₂ G₃₅₃ G₃₅₄ G₃₅₅ G₃₅₆ G₃₅₇ G₃₅₈ G₃₅₉ G₃₆₀ G₃₆₁ G₃₆₂ G₃₆₃ G₃₆₄ G₃₆₅ G₃₆₆ G₃₆₇ G₃₆₈ G₃₆₉ G₃₇₀ G₃₇₁ G₃₇₂ G₃₇₃ G₃₇₄ G₃₇₅ G₃₇₆ G₃₇₇ G₃₇₈ G₃₇₉ G₃₈₀ G₃₈₁ G₃₈₂ G₃₈₃ G₃₈₄ G₃₈₅ G₃₈₆ G₃₈₇ G₃₈₈ G₃₈₉ G₃₉₀ G₃₉₁ G₃₉₂ G₃₉₃ G₃₉₄ G₃₉₅ G₃₉₆ G₃₉₇ G₃₉₈ G₃₉₉ G₄₀₀ G₄₀₁ G₄₀₂ G₄₀₃ G₄₀₄ G₄₀₅ G₄₀₆ G₄₀₇ G₄₀₈ G₄₀₉ G₄₁₀ G₄₁₁ G₄₁₂ G₄₁₃ G₄₁₄ G₄₁₅ G₄₁₆ G₄₁₇ G₄₁₈ G₄₁₉ G₄₂₀ G₄₂₁ G₄₂₂ G₄₂₃ G₄₂₄ G₄₂₅ G₄₂₆ G₄₂₇ G₄₂₈ G₄₂₉ G₄₃₀ G₄₃₁ G₄₃₂ G₄₃₃ G₄₃₄ G₄₃₅ G₄₃₆ G₄₃₇ G₄₃₈ G₄₃₉ G₄₄₀ G₄₄₁ G₄₄₂ G₄₄₃ G₄₄₄ G₄₄₅ G₄₄₆ G₄₄₇ G₄₄₈ G₄₄₉ G₄₅₀ G₄₅₁ G₄₅₂ G₄₅₃ G₄₅₄ G₄₅₅ G₄₅₆ G₄₅₇ G₄₅₈ G₄₅₉ G₄₆₀ G₄₆₁ G₄₆₂ G₄₆₃ G₄₆₄ G₄₆₅ G₄₆₆ G₄₆₇ G₄₆₈ G₄₆₉ G₄₇₀ G₄₇₁ G₄₇₂ G₄₇₃ G₄₇₄ G₄₇₅ G₄₇₆ G₄₇₇ G₄₇₈ G₄₇₉ G₄₈₀ G₄₈₁ G₄₈₂ G₄₈₃ G₄₈₄ G₄₈₅ G₄₈₆ G₄₈₇ G₄₈₈ G₄₈₉ G₄₉₀ G₄₉₁ G₄₉₂ G₄₉₃ G₄₉₄ G₄₉₅ G₄₉₆ G₄₉₇ G₄₉₈ G₄₉₉ G₅₀₀ G₅₀₁ G₅₀₂ G₅₀₃ G₅₀₄ G₅₀₅ G₅₀₆ G₅₀₇ G₅₀₈ G₅₀₉ G₅₁₀ G₅₁₁ G₅₁₂ G₅₁₃ G₅₁₄ G₅₁₅ G₅₁₆ G₅₁₇ G₅₁₈ G₅₁₉ G₅₂₀ G₅₂₁ G₅₂₂ G₅₂₃ G₅₂₄ G₅₂₅ G₅₂₆ G₅₂₇ G₅₂₈ G₅₂₉ G₅₃₀ G₅₃₁ G₅₃₂ G₅₃₃ G₅₃₄ G₅₃₅ G₅₃₆ G₅₃₇ G₅₃₈ G₅₃₉ G₅₄₀ G₅₄₁ G₅₄₂ G₅₄₃ G₅₄₄ G₅₄₅ G₅₄₆ G₅₄₇ G₅₄₈ G₅₄₉ G₅₅₀ G₅₅₁ G₅₅₂ G₅₅₃ G₅₅₄ G₅₅₅ G₅₅₆ G₅₅₇ G₅₅₈ G₅₅₉ G₅₆₀ G₅₆₁ G₅₆₂ G₅₆₃ G₅₆₄ G₅₆₅ G₅₆₆ G₅₆₇ G₅₆₈ G₅₆₉ G₅₇₀ G₅₇₁ G₅₇₂ G₅₇₃ G₅₇₄ G₅₇₅ G₅₇₆ G₅₇₇ G₅₇₈ G₅₇₉ G₅₈₀ G₅₈₁ G₅₈₂ G₅₈₃ G₅₈₄ G₅₈₅ G₅₈₆ G₅₈₇ G₅₈₈ G₅₈₉ G₅₉₀ G₅₉₁ G₅₉₂ G₅₉₃ G₅₉₄ G₅₉₅ G₅₉₆ G₅₉₇ G₅₉₈ G₅₉₉ G₆₀₀ G₆₀₁ G₆₀₂ G₆₀₃ G₆₀₄ G₆₀₅ G₆₀₆ G₆₀₇ G₆₀₈ G₆₀₉ G₆₁₀ G₆₁₁ G₆₁₂ G₆₁₃ G₆₁₄ G₆₁₅ G₆₁₆ G₆₁₇ G₆₁₈ G₆₁₉ G₆₂₀ G₆₂₁ G₆₂₂ G₆₂₃ G₆₂₄ G₆₂₅ G₆₂₆ G₆₂₇ G₆₂₈ G₆₂₉ G₆₃₀ G₆₃₁ G₆₃₂ G₆₃₃ G₆₃₄ G₆₃₅ G₆₃₆ G₆₃₇ G₆₃₈ G₆₃₉ G₆₄₀ G₆₄₁ G₆₄₂ G₆₄₃ G₆₄₄ G₆₄₅ G₆₄₆ G₆₄₇ G₆₄₈ G₆₄₉ G₆₅₀ G₆₅₁ G₆₅₂ G₆₅₃ G₆₅₄ G₆₅₅ G₆₅₆ G₆₅₇ G₆₅₈ G₆₅₉ G₆₆₀ G₆₆₁ G₆₆₂ G₆₆₃ G₆₆₄ G₆₆₅ G₆₆₆ G₆₆₇ G₆₆₈ G₆₆₉ G₆₇₀ G₆₇₁ G₆₇₂ G₆₇₃ G₆₇₄ G₆₇₅ G₆₇₆ G₆₇₇ G₆₇₈ G₆₇₉ G₆₈₀ G₆₈₁ G₆₈₂ G₆₈₃ G₆₈₄ G₆₈₅ G₆₈₆ G₆₈₇ G₆₈₈ G₆₈₉ G₆₉₀ G₆₉₁ G₆₉₂ G₆₉₃ G₆₉₄ G₆₉₅ G₆₉₆ G₆₉₇ G₆₉₈ G₆₉₉ G₇₀₀ G₇₀₁ G₇₀₂ G₇₀₃ G₇₀₄ G₇₀₅ G₇₀₆ G₇₀₇ G₇₀₈ G₇₀₉ G₇₁₀ G₇₁₁ G₇₁₂ G₇₁₃ G₇₁₄ G₇₁₅ G₇₁₆ G₇₁₇ G₇₁₈ G₇₁₉ G₇₂₀ G₇₂₁ G₇₂₂ G₇₂₃ G₇₂₄ G₇₂₅ G₇₂₆ G₇₂₇ G₇₂₈ G₇₂₉ G₇₃₀ G₇₃₁ G₇₃₂ G₇₃₃ G₇₃₄ G₇₃₅ G₇₃₆ G₇₃₇ G₇₃₈ G₇₃₉ G₇₄₀ G₇₄₁ G₇₄₂ G₇₄₃ G₇₄₄ G₇₄₅ G₇₄₆ G₇₄₇ G₇₄₈ G₇₄₉ G₇₅₀ G₇₅₁ G₇₅₂ G₇₅₃ G₇₅₄ G₇₅₅ G₇₅₆ G₇₅₇ G₇₅₈ G₇₅₉ G₇₆₀ G₇₆₁ G₇₆₂ G₇₆₃ G₇₆₄ G₇₆₅ G₇₆₆ G₇₆₇ G₇₆₈ G₇₆₉ G₇₇₀ G₇₇₁ G₇₇₂ G₇₇₃ G₇₇₄ G₇₇₅ G₇₇₆ G₇₇₇ G₇₇₈ G₇₇₉ G₇₈₀ G₇₈₁ G₇₈₂ G₇₈₃ G₇₈₄ G₇₈₅ G₇₈₆ G₇₈₇ G₇₈₈ G₇₈₉ G₇₉₀ G₇₉₁ G₇₉₂ G₇₉₃ G₇₉₄ G₇₉₅ G₇₉₆ G₇₉₇ G₇₉₈ G₇₉₉ G₈₀₀ G₈₀₁ G₈₀₂ G₈₀₃ G₈₀₄ G₈₀₅ G₈₀₆ G₈₀₇ G₈₀₈ G₈₀₉ G₈₁₀ G₈₁₁ G₈₁₂ G₈₁₃ G₈₁₄ G₈₁₅ G₈₁₆ G₈₁₇ G₈₁₈ G₈₁₉ G₈₂₀ G₈₂₁ G₈₂₂ G₈₂₃ G₈₂₄ G₈₂₅ G₈₂₆ G₈₂₇ G₈₂₈ G₈₂₉ G₈₃₀ G₈₃₁ G₈₃₂ G₈₃₃ G₈₃₄ G₈₃₅ G₈₃₆ G₈₃₇ G₈₃₈ G₈₃₉ G₈₄₀ G₈₄₁ G₈₄₂ G₈₄₃ G₈₄₄ G₈₄₅ G₈₄₆ G₈₄₇ G₈₄₈ G₈₄₉ G₈₅₀ G₈₅₁ G₈₅₂ G₈₅₃ G₈₅₄ G₈₅₅ G₈₅₆ G₈₅₇ G₈₅₈ G₈₅₉ G₈₆₀ G₈₆₁ G₈₆₂ G₈₆₃ G₈₆₄ G₈₆₅ G₈₆₆ G₈₆₇ G₈₆₈ G₈₆₉ G₈₇₀ G₈₇₁ G₈₇₂ G₈₇₃ G₈₇₄ G₈₇₅ G₈₇₆ G₈₇₇ G₈₇₈ G₈₇₉ G₈₈₀ G₈₈₁ G₈₈₂ G₈₈₃ G₈₈₄ G₈₈₅ G₈₈₆ G₈₈₇ G₈₈₈ G₈₈₉ G₈₉₀ G₈₉₁ G₈₉₂ G₈₉₃ G₈₉₄ G₈₉₅ G₈₉₆ G₈₉₇ G₈₉₈ G₈₉₉ G₉₀₀ G₉₀₁ G₉₀₂ G₉₀₃ G₉₀₄ G₉₀₅ G₉₀₆ G₉₀₇ G₉₀₈ G₉₀₉ G₉₁₀ G₉₁₁ G₉₁₂ G₉₁₃ G₉₁₄ G₉₁₅ G₉₁₆ G₉₁₇ G₉₁₈ G₉₁₉ G₉₂₀ G₉₂₁ G₉₂₂ G₉₂₃ G₉₂₄ G₉₂₅ G₉₂₆ G₉₂₇ G₉₂₈ G₉₂₉ G₉₃₀ G₉₃₁ G₉₃₂ G₉₃₃ G₉₃₄ G₉₃₅ G₉₃₆ G₉₃₇ G₉₃₈ G₉₃₉ G₉₄₀ G₉₄₁ G₉₄₂ G₉₄₃ G₉₄₄ G₉₄₅ G₉₄₆ G₉₄₇ G₉₄₈ G₉₄₉ G₉₅₀ G₉₅₁ G₉₅₂ G₉₅₃ G₉₅₄ G₉₅₅ G₉₅₆ G₉₅₇ G₉₅₈ G₉₅₉ G₉₆₀ G₉₆₁ G₉₆₂ G₉₆₃ G₉₆₄ G₉₆₅ G₉₆₆ G₉₆₇ G₉₆₈ G₉₆₉ G₉₇₀ G₉₇₁ G₉₇₂ G₉₇₃ G₉₇₄ G₉₇₅ G₉₇₆ G₉₇₇ G₉₇₈ G₉₇₉ G₉₈₀ G₉₈₁ G₉₈₂ G₉₈₃ G₉₈₄ G₉₈₅ G₉₈₆ G₉₈₇ G₉₈₈ G₉₈₉ G₉₉₀ G₉₉₁ G₉₉₂ G₉₉₃ G₉₉₄ G₉₉₅ G₉₉₆ G₉₉₇ G₉₉₈ G₉₉₉ G₁₀₀₀ G₁₀₀₁ G₁₀₀₂ G₁₀₀₃ G₁₀₀₄ G₁₀₀₅ G₁₀₀₆ G₁₀₀₇ G₁₀₀₈ G₁₀₀₉ G₁₀₁₀ G₁₀₁₁ G₁₀₁₂ G₁₀₁₃ G₁₀₁₄ G₁₀₁₅ G₁₀₁₆ G₁₀₁₇ G₁₀₁₈ G₁₀₁₉ G₁₀₂₀ G₁₀₂₁ G₁₀₂₂ G₁₀₂₃ G₁₀₂₄ G₁₀₂₅ G₁₀₂₆ G₁₀₂₇ G₁₀₂₈ G₁₀₂₉ G₁₀₃₀ G₁₀₃₁ G₁₀₃₂ G₁₀₃₃ G₁₀₃₄ G₁₀₃₅ G₁₀₃₆ G₁₀₃₇ G₁₀₃₈ G₁₀₃₉ G₁₀₄₀ G₁₀₄₁ G₁₀₄₂ G₁₀₄₃ G₁₀₄₄ G₁₀₄₅ G₁₀₄₆ G₁₀₄₇ G₁₀₄₈ G₁₀₄₉ G₁₀₅₀ G₁₀₅₁ G₁₀₅₂ G₁₀₅₃ G₁₀₅₄ G₁₀₅₅ G₁₀₅₆ G₁₀₅₇ G₁₀₅₈ G₁₀₅₉ G₁₀₆₀ G₁₀₆₁ G₁₀₆₂ G₁₀₆₃ G₁₀₆₄ G₁₀₆₅ G₁₀₆₆ G₁₀₆₇ G₁₀₆₈ G₁₀₆₉ G₁₀₇₀ G₁₀₇₁ G₁₀₇₂ G₁₀₇₃ G₁₀₇₄ G₁₀₇₅ G₁₀₇₆ G₁₀₇₇ G₁₀₇₈ G₁₀₇₉ G₁₀₈₀ G₁₀₈₁ G₁₀₈₂ G₁₀₈₃ G₁₀₈₄ G₁₀₈₅ G₁₀₈₆ G₁₀₈₇ G₁₀₈₈ G₁₀₈₉ G₁₀₉₀ G₁₀₉₁ G₁₀₉₂ G₁₀₉₃ G₁₀₉₄ G₁₀₉₅ G₁₀₉₆ G₁₀₉₇ G₁₀₉₈ G₁₀₉₉ G₁₁₀₀ G₁₁₀₁ G₁₁₀₂ G₁₁₀₃ G₁₁₀₄ G₁₁₀₅ G₁₁₀₆ G₁₁₀₇ G₁₁₀₈ G₁₁₀₉ G₁₁₁₀ G₁₁₁₁ G₁₁₁₂ G₁₁₁₃ G₁₁₁₄ G₁₁₁₅ G₁₁₁₆ G₁₁₁₇ G₁₁₁₈ G₁₁₁₉ G₁₁₂₀ G₁₁₂₁ G₁₁₂₂ G₁₁₂₃ G₁₁₂₄ G₁₁₂₅ G₁₁₂₆ G₁₁₂₇ G₁₁₂₈ G₁₁₂₉ G₁₁₃₀ G₁₁₃₁ G₁₁₃₂ G₁₁₃₃ G₁₁₃₄ G₁₁₃₅ G₁₁₃₆ G₁₁₃₇ G₁₁₃₈ G₁₁₃₉ G₁₁₄₀ G₁₁₄₁ G₁₁₄₂ G₁₁₄₃ G₁₁₄₄ G₁₁₄₅ G₁₁₄₆ G₁₁₄₇ G₁₁₄₈ G₁₁₄₉ G₁₁₅₀ G₁₁₅₁ G₁₁₅₂ G₁₁₅₃ G₁₁₅₄ G₁₁₅₅ G₁₁₅₆ G₁₁₅₇ G₁₁₅₈ G₁₁₅₉ G₁₁₆₀ G₁₁₆₁ G₁₁₆₂ G₁₁₆₃ G₁₁₆₄ G₁₁₆₅ G₁₁₆₆ G₁₁₆₇ G₁₁₆₈ G₁₁₆₉ G<

4.)、3'-水酸基をホスフィン酸誘導体あるいはH-ホスホネート誘導体に導き (M. D. Matteucci et al., Tetrahedron Lett., vol. 21, 719 (1980). S. L. Beaucaage et al., Tetrahedron Lett., vol. 22, 1859 (1981). L. J. McBride et al., Tetrahedron Lett., vol. 24, 245 (1983). B. C. Froehler et al., Nucleic Acids Res., vol. 14, 5399 (1986). B. C. Froehler et al., Tetrahedron Lett., vol. 27, 469 (1986). P. J. Garegg et al., Tetrahedron Lett., vol. 27, 4051 (1986). E. Uhlman et al., Chemical Reviews, vol. 90, No. 4, 543 (1990).) の方法にしたがって行なう。以下に、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体 (I a) および (I b) の製造法について詳細に説明する。

〔オリゴヌクレオチド誘導体 (I a) の製造法〕 まず、オリゴヌクレオチド誘導体に導入するための糖残基は、まず原料となる糖化合物をたとえば公知方法に従って、必要に応じてその2級糖水酸基を保護した後 ("Reagents for Organic Synthesis", vol. 1, 453, L. Fieser (eds), John Wiley and Sons, INC. (1967). D. D. Reynolds et al., Org. Syn., Coll. vol. 3, 432 (1955). R. R. Schmidt, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., vol. 25, 212 (1986).) の1級水酸基を前記参考文献記載の公知方法にしたがって、ホスフィン酸誘導体あるいはH-ホスホネート誘導体に導き、それらをユニットとして前記参考文献記載の公知のホスホロアミダイト法、H-ホスホネート法などにしたがって合成することができる。以下に、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体 (I a) の製造法を、QがYであり、Yで表される糖残基の糖がガラクトース誘導体であるオリゴヌクレオチド誘導体の製造法を例に挙げて説明するが、Yが他の基であるオリゴヌクレオチド誘導体 (I a) およびQが式

【0169】

【化90】



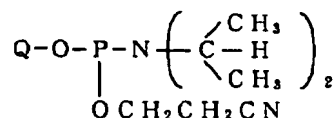
【0170】であるオリゴヌクレオチド誘導体 (I a) も同様にして得ることができる。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体 (I a) (例、ガラクトース誘導体を導入したオリゴヌクレオチド誘導体) は、以下の反応 (a) から (c) で示す方法によって製造することができる。適当な保護基によって保護された糖誘導体 (例、テトラ-O-ベンゾイルガラクトース) の6位水酸基のリン酸化反応は公知文献 (M. D. Matteucci et al., Tetrahedron Lett., vol. 21, 719 (1980). S. L. Beaucaage et al., Tetrahedron Lett., vol. 22, 1859 (1981). L. J. McBride et al., Tetrahedron Lett., vol. 24, 245

(1983). B. C. Froehler et al., Nucleic Acids Res., vol. 14, 5399 (1986). B. C. Froehler et al., Tetrahedron Lett., vol. 27, 469 (1986). P. J. Garegg et al., Tetrahedron Lett., vol. 27, 4051 (1986). E. Uhlman et al., Chemical Reviews, vol. 90, No. 4, 543 (1990).) の方法にしたがって行なう。

【0171】以下の製造法で用いられる式

【0172】

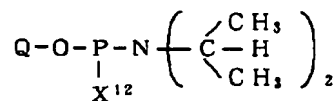
【化91】



【0173】〔式中、Qは前記と同意義を示す。〕で表される糖誘導体 (A)、および式

【0174】

【化92】



【0175】〔式中、Qは前記と同意義を示し、X¹²はC₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示す。〕で表される糖誘導体 (B) は、オリゴヌクレオチド誘導体 (I) の製造中間体として有用である。糖誘導体 (A) および (B) において、QがYである場合、Yで表される糖残基の糖としては、前述のオリゴヌクレオチド誘導体 (I) で述べたものと同様のものが用いられる。なかでも、①ガラクトース、マンノース、メリビオース、ゲンチオビオースおよびイソマルトリオースまたはこれらの水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基 (例えば、アセチル基など)、ベンゾイル基などの適当な基で置換されているもの、②グルコシドおよびチオグルコシドまたはこれらの水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基 (例えば、アセチル基など) ベンゾイル基、C₁₋₂₀アルキル基 (例えば、オクチル基など) などの適当な基で置換されているもの、③グルコサミンおよびガラクトサミンまたはこれらの水酸基がハロゲン原子 (例えば、フルオロなど) で置換されていてもよいC₁₋₅アルキルカルボニル基 (例えば、アセチル基など)、ベンゾイル基などの適当な基で置換されているものなどが好ましい。具体的には、例えば1,2,3,4-O-テトラアセチルガラクトース、1,2,3,4-O-テトラアセチルマンノース、1-O-n-オクチル-2,3,4-O-トリベンゾイルグルコシド、1-O-n-オクチル-2,3,4-O-トリベンゾイルチオグルコシド、1-O-フェニル-2,3,4-O-トリベンゾイルグルコシド、1,3,4-O-トリベンゾイル、2-N-ベンゾイルガラクトサミン、1,3,4-O-トリアセチル、2-N-アセチルガラクトサミン、1,

81

3,4-0-トリアセチル,2-N-アセチルグルコサミン、1,3,4-0-トリベンゾイル,2-N-トリフルオロアセチルガラクトサミン、1,3,4-0-トリベンゾイル,2-N-トリフルオロアセチルグルコサミン、ヘプタベンゾイルメリピオース、ヘプタベンゾイルゲンチオピオース、オクタベンゾイルイソマルトトリオースなどが好適である。糖誘導体 (B) においては、特に1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド、1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシドなどがより好ましい。糖誘導体 (B) におけるX¹²で表されるC₁₋₅アルキル基、C₁₋₅アルコキシ基、C₁₋₅モノアルキルアミノ基、置換されていてもよい芳香環基としては、前述のX¹、X²およびX³と同様のものを用いることができ、例えばフェニル基などが好ましい。

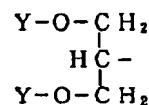
【0176】QがYである糖誘導体 (A) および (B) としては、オリゴヌクレオチドの5'末端側に結合して、例えば、Gal (ガラクトース)、Man (マンノース)、n-oct-Glc (n-オクチルグルコシド)、n-oct-SGlc (n-オクチルチオグルコシド)、PhGlc (フェニルグルコシド)、PhGal (フェニルガラクトシド)、GalN (ガラクトサミン)、N-AcGal (N-アセチルガラクトサミン)、N-BzGal (N-ベンゾイルガラクトサミン)、GuIN (グルコサミン)、N-AcGuI (N-アセチルグルコサミン)、MeI (メリピオース)、Gen (ゲンチオピオース)、Iso (イソマルトトリオース) などに導かれ得るものなどが好適である。特に、QがYである糖誘導体 (B) としては、オリゴヌクレオチドの5'末端側に結合して、例えば、n-oct-Glc (n-オクチルグルコシド)、n-oct-S*30

82

*Glc (n-オクチルチオグルコシド) などに導かれ得るものなどが好適である。QがYである糖誘導体 (A) および (B) としては、具体的には、これら糖の水酸基が適当に置換されているものなどが好ましく、例えば実施例1、2、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29および31で製造されるものなどが好ましい。Qが式

【0177】

【化93】

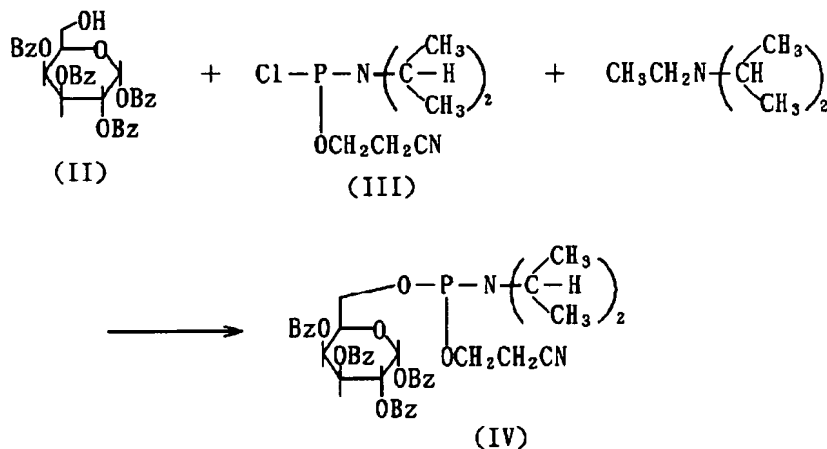


【0178】である糖誘導体 (A) および (B) としては、オリゴヌクレオチドの5'末端側に結合して、例えば、Gal (ガラクトース)、Man (マンノース)、Glu (グルコース) などに、特にGal (ガラクトース) などに導かれ得るものなどが好適である。例えば、Yで表される糖残基の糖が水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基 (例えば、アセチル基など) などで置換されていてもよい単糖類 (例えば、ガラクトース、マンノース、グルコースなど、好ましくはガラクトースなど) などである糖誘導体 (A) および (B) などが好適であり、具体的には実施例63で製造されるものなどが好ましい。

(1) X¹、X⁴およびX⁷がそれぞれOH基またはSH基であるオリゴヌクレオチド誘導体 (Ia) の製造法

【0179】

【化94】

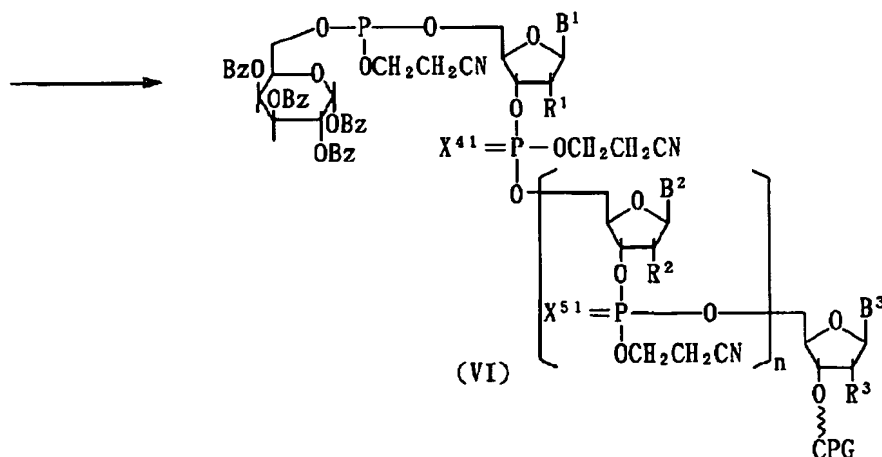
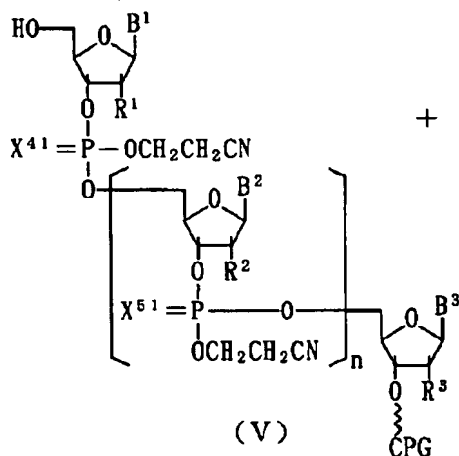


【0180】〔式中、Bzはベンゾイル基を示す。〕

反応式 (a) は化合物 (II) の水酸基を、Pに隣接するOをシアノエチルで保護されたリン酸化剤 (III) と反応させ、化合物 (IV) を得るものである。化合物 (II) 1ミリモルに対して1~2ミリモル程度のリン酸化剤

(III) と2~5ミリモル程度のエチルジイソプロピルアミンを用い、溶媒としてハロゲン化炭化水素類 (例、塩化メチレン、クロロホルム)、エーテル類 (例、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン)、芳香族系炭化水素類 (例、ベンゼン、トルエン)、アセトニトリル、ピ

リジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アルコール類（例、メタノール、エタノール）を用いることができるが、この中でも望ましくは塩化メチレンを用い、通常反応温度 -20°C から 70°C 程度、望ましくは 15°C から 35°C 程度で、通常反応時間0.5時間から5時間程度、望ましくは1時間から2時間程度反応させて化合物(IV)を得る。原料化合物(II)および(III)は、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって製造することができる。例えば、原料化合物(II)は公知文献("Reagents for Organic Synthesis", vol. 1, 453, L. Fieser (eds), John Wiley and Sons, INC. (1967). D. D. Reynolds et al., Org. Syn., Coll. vol. 3, 432(1955). R. R. Schmidt, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., vol. 25, 212 (1986).)の方法*



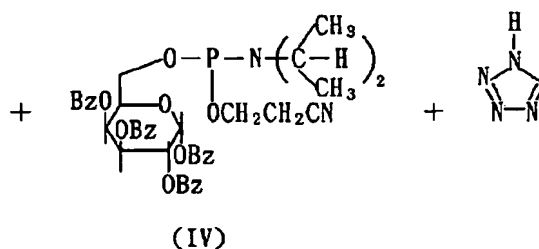
【0183】〔式中、Bzはベンゾイル基を示し、X⁴¹およびX⁵¹はそれぞれOまたはSを示し、X⁴¹はnの繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なってもよく、CPGは固相担体 (Controlled Pore Glass) を示し、その他の記号は前記と同意義を示す。〕

*にしたがって製造することができる。原料化合物(II)は公知文献(M. D. Matteucci et al., Tetrahedron Lett., vol. 21, 719 (1980). S. L. Beaucage et al., Tetrahedron Lett., vol. 22, 1859 (1981). L. J. McBride et al., Tetrahedron Lett., vol. 24, 245 (1983). B. C. Froehner et al., Nucleic Acids Res., vol. 14, 5399 (1986). B. C. Froehner et al., Tetrahedron Lett., vol. 27, 469 (1986). P. J. Garegg et al., Tetrahedron Lett., vol. 27, 4051 (1986). E. Uhlman et al., Chemical Reviews, vol. 90, No. 4, 543 (1990).)の方法にしたがって製造することができる。

【0181】反応式(b)

【0182】

【化95】



反応式(b)は、反応式(a)で得られた化合物(IV)と、適当に保護されている(例えば、Pに隣接するOがシアノエチルで保護されている)ヌクレオチド誘導体またはオリゴヌクレオチド誘導体(V)との反応である。

50 化合物(IV) 1マイクロモルに対して20~100マイ

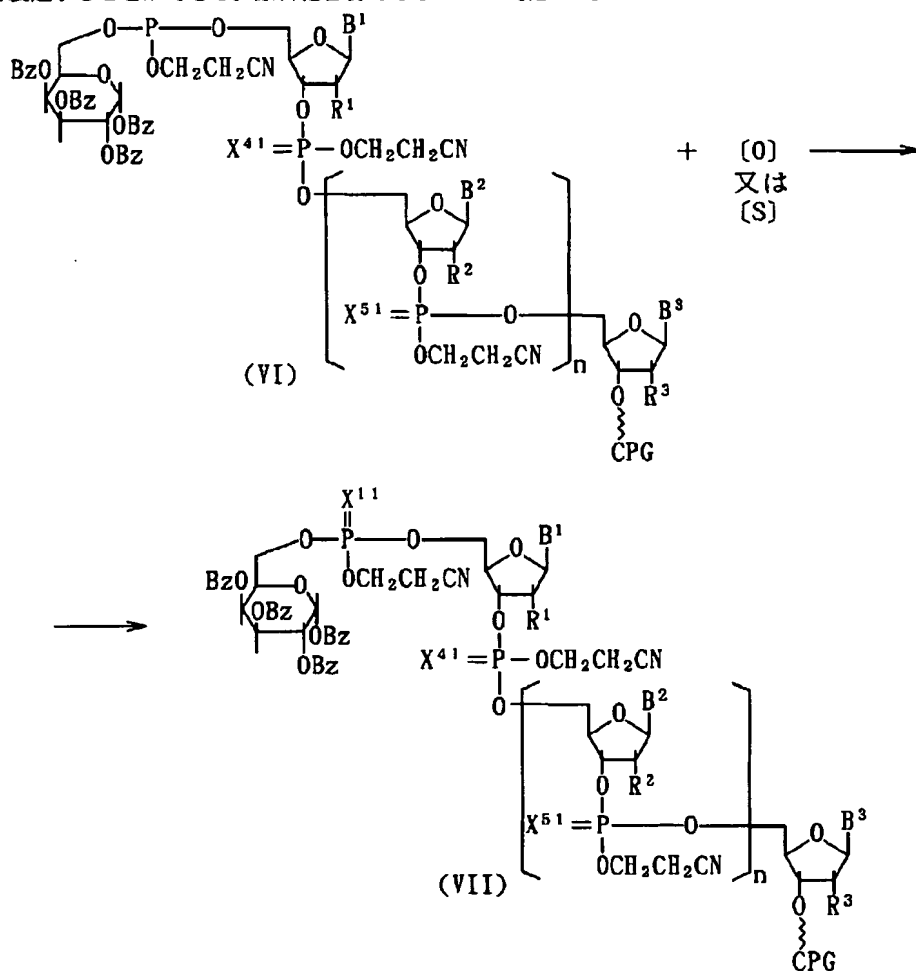
クロモル程度の垂リン酸化された糖誘導体化合物 (V) と 20~100 マイクロモル程度の 1-H テトラゾールを用い、溶媒としてハロゲン化炭化水素類 (例、塩化メチレン、クロロホルム)、エーテル類 (例、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン)、芳香族系炭化水素類 (例、ベンゼン、トルエン)、アセトニトリル、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アルコール類 (例、メタノール、エタノール) を用いることができるが、この中でも望ましくはアセトニトリルを用い、通常反応温度 -20℃ から 70℃ 程度、望ましくは 15℃ から 35℃ 程度で、通常反応時間 3 分から 30 分間程度、望ましくは 5 分から 20 分間程度反応させて化合物 (VI) を得る。原料化合物である 1-H テトラゾールは、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって製造することができる。原料化合物である *

* 適当に保護されていてもよいヌクレオチド誘導体またはオリゴヌクレオチド誘導体 (V) は、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって製造することができる。すなわち、一般のヌクレオチド誘導体を用いてオリゴヌクレオチドを合成する方法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach" M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなうことができる。一連のヌクレオチド鎖伸長反応はマニュアル法、自動合成機を用いる方法のいずれによっても可能であるが、自動合成機でおこなうことにより操作法の簡便化、また合成の正確性の点から自動合成機を用いる方法が望ましい。

【0184】 反応式 (c)

【0185】

【化96】



【0186】 [式中、Bz はベンゾイル基を示し、X¹¹、X⁴¹ および X⁵¹ はそれぞれ O または S を示し、X⁴¹ は n の繰り返しにおいてそれぞれ同一または異なっているとしてもよく、CPG は固相担体 (Controlled Pore Glas

s) を示し、その他の記号は前記と同意義を示す。] 反応式 (c) は、反応式 (b) で得られた化合物 (VI) を酸化または硫化して化合物 (VII) を得るものである。化合物 (VI) 1 マイクロモルに対して、酸化剤 (例

例えば、mCPBA、NBA、NBS、 I_2 、DMSO-DCCなど、好ましくは I_2 ）または硫化剤（例えば、ジ（フェニルアセチル）ジスルフィド、3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン、テトラエチルチウラムジスルフィド、ジベンゾイルテトラスルフィド、ジベンゾイルトリスルフィド、ジベンゾイルジスルフィドなど、好ましくはテトラエチルチウラムジスルフィドなど）などを通常20マイクロモル～100マイクロモル程度を加えて、通常反応温度-20℃から70℃程度、望ましくは15℃から35℃程度である。反応時間は、酸化反応の場合は、通常反応時間30秒間から100分間程度、望ましくは30秒間から5分間程度であり、硫化反応の場合は、通常反応時間30秒間から100分間程度、望ましくは30秒間から20分間程度である。そして、得られた化合物(VII)の保護基を除去することによって、 X^1 、 X^4 および X^5 がそれぞれOH基またはSH基であるオリゴヌクレオチド誘導体(Ia)を製造*

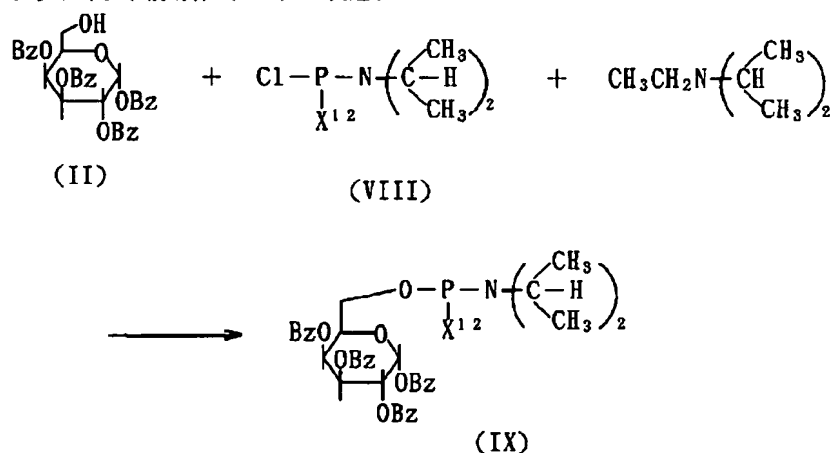
ることができる。保護基の除去方法としてはそれ自体公知またはそれに準じる方法が用いられるが、例えばまずアンモニア/ピリジン(5:1)溶液を60℃で6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと、リン酸基、塩基部分、糖部分の保護基の除去をおこなう。すべての保護基を除いた後、逆相HPLCなどを用いて精製することができる("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait(ed), IRL PRESS, (1984).)。

【0187】(2) X^1 、 X^4 および X^5 がそれぞれ C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基または C_{1-5} モノアルキルアミノ基であるオリゴヌクレオチド誘導体(Ia)の製造法

反応式(d)

【0188】

【化97】



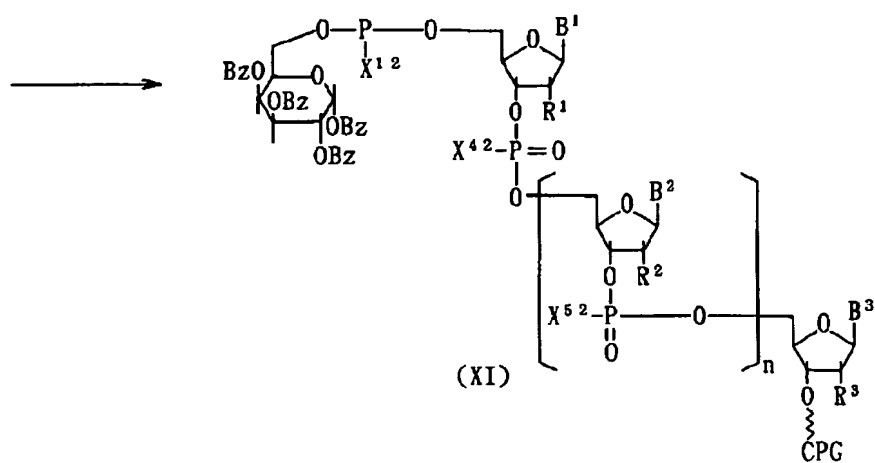
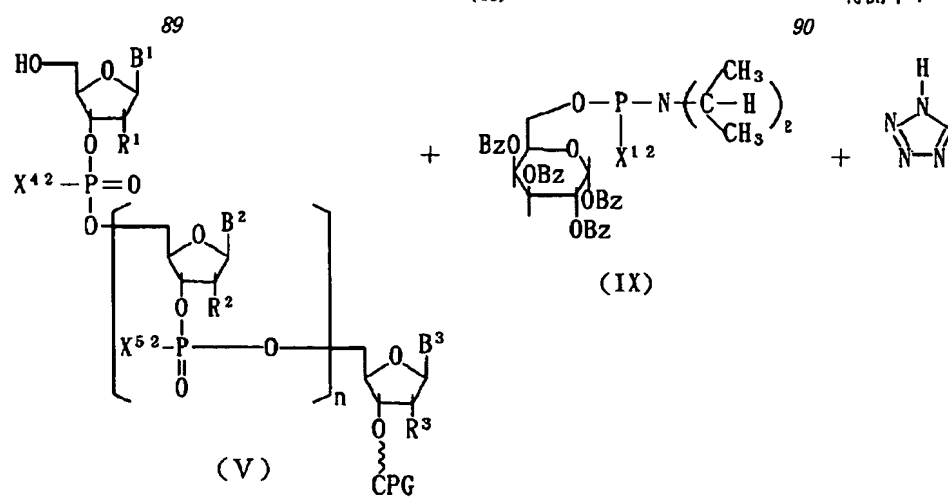
【0189】反応式(e)

【0190】

【化98】

(46)

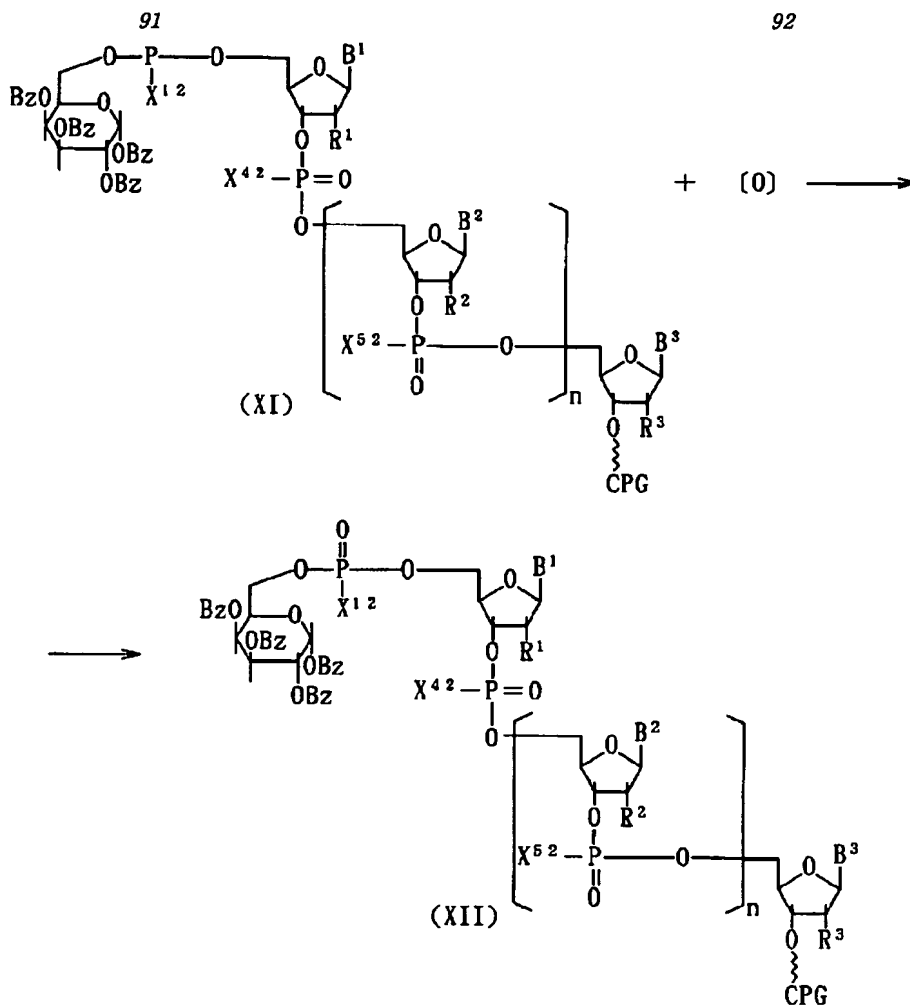
特開平7-112997



【0191】反応式 (f)

【0192】

【化99】



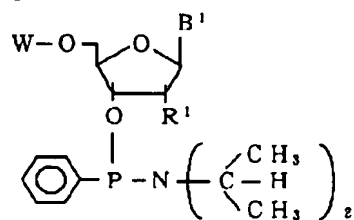
【0193】原料化合物であるリン酸化剤 (VIII) は、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって製造することができる。例えば、公知文献 (M. D. Matteuciet al., Tetrahedron Lett., vol. 21, 719 (1980). S. L. Beaucage et al., Tetrahedron Lett., vol. 22, 1859 (1981). L. J. McBride et al. Tetrahedron Lett., vol. 24, 245 (1983). B. C. Froehler et al., Nucleic Acids Res., vol. 14, 5399 (1986). B. C. Froehler et al., Tetrahedron Lett., vol. 27, 469 (1986). P. J. Garegg et al., Tetrahedron Lett., vol. 27, 4051 (1986). E. Uhlman et al., Chemical Reviews, vol. 90, No. 4, 543 (1990).) の方法にしたがって製造することができる。反応式 (d) は上記反応式 (a) と、反応式 (e) は上記反応式 (b) と、反応式 (f) は上記反応式 (c) と同様にして行うことができる。そして、得られた化合物 (XII) の保護基を除去することによって、 X^1 、 X^4 および X^5 がそれぞれ C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基または C_{1-5} モノアルキルアミノ基であるオリゴヌクレオチド誘導体 (I a) を製造する 50

ことができる。

【0194】〔オリゴヌクレオチド誘導体 (I b) の製造法〕以下の製造法で用いられる式

【0195】

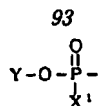
【化100】



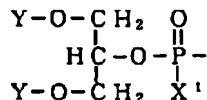
【0196】〔式中、W、 B^1 および R^1 は前記と同意義を示す。〕で表されるヌクレオチド誘導体は、オリゴヌクレオチド誘導体 (I b) の製造中間体として有用である。Wとしては、例えば水素原子、式

【0197】

【化101】



【0198】または
【0199】
【化102】



【0200】〔式中、YおよびX¹は前記と同意義を示す。〕で表される基などが好ましい。Wが式

【0201】
【化103】



【0202】で表される基の場合、Yで示される糖残基の糖としては、例えば①ガラクトース、マンノース、メリピオース、ゲンチオピオースおよびイソマルトトリオースまたはこれらのヘミアセタール性水酸基以外の水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基またはベンゾイル基で置換されているもの、②グルコシドおよびチオグルコシドまたはこれらの水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基、ベンゾイル基またはC₁₋₂₀アルキル基で置換されているもの、または③グルコサミンおよびガラクトサミンまたはこれらのヘミアセタール性水酸基以外の水酸基がハロゲン原子で置換されていてもよいC₁₋₅アルキルカルボニル基あるいはベンゾイル基で置換されているものなどが好ましい。具体的には、1,2,3,4-O-テトラアセチルガラクトース、1,2,3,4-O-テトラアセチルマンノース、1-O-α-オクチル-2,3,4-O-トリベンゾイルグルコシド、1-O-α-オクチル-2,3,4-O-トリベンゾイルチオグルコシド、1-O-フェニル-2,3,4-O-トリベンゾイルグルコシド、1,3,4-O-トリベンゾイル,2-N-ベンゾイルガラクトサミン、1,3,4-O-トリアセチル,2-N-アセチルガラクトサミン、1,3,4-O-トリアセチル,2-N-アセチルグルコサミン、1,3,4-O-トリベンゾイル,2-N-トリフルオロアセチルガラクトサミン、1,3,4-O-トリベンゾイル,2-N-トリフルオロアセチルグルコサミン、ヘプタベンゾイルメリピオース、ヘプタベンゾイルゲンチオピオース、オクタベンゾイルイソマルトトリオースなどが好適である。X¹としては、例えば①OH基、②SH基、③C₁₋₅アルキル基、④C₁₋₅アルコキシ基、⑤C₁₋₅モノアルキルアミノ基、または⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいフェニル基などが好ましく、特にOH基、SH基、メチル基、フェニル基などが好適である。Wが

10

20

30

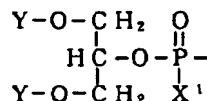
40

50

94

式

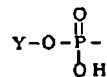
【0203】
【化104】



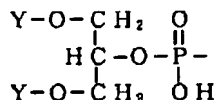
【0204】〔式中、YおよびX¹は前記と同意義を示す。〕で表される基の場合、Yで示される糖残基の糖としては、例えば水酸基がC₁₋₅アルキルカルボニル基（例えば、アセチル基など）などで置換されていてもよい単糖類（例えば、ガラクトース、マンノースまたはグルコースなど、好ましくはガラクトースなど）などが好適である。X¹としては、例えば①OH基、②SH基、③C₁₋₅アルキル基、④C₁₋₅アルコキシ基、⑤C₁₋₅モノアルキルアミノ基、または⑥ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルキルカルボニル基、OH基、ニトロ基、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルコキシ基、フェニル基およびナフチル基から成る群から選ばれる1ないし5個程度の置換基で置換されていてもよいフェニル基などが好ましく、特にOH基、SH基、メチル基、フェニル基などが好適である。

【0205】以下に、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I b）の製造法を、5'-末端にホスホネートタイプのヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチド誘導体（I b-1）で、Wが保護基；P i x基（フェニルキサンテニル基）であるオリゴヌクレオチド誘導体の製造法を例に挙げて説明するが、Wが式

【0206】
【化105】



【0207】または式
【0208】
【化106】



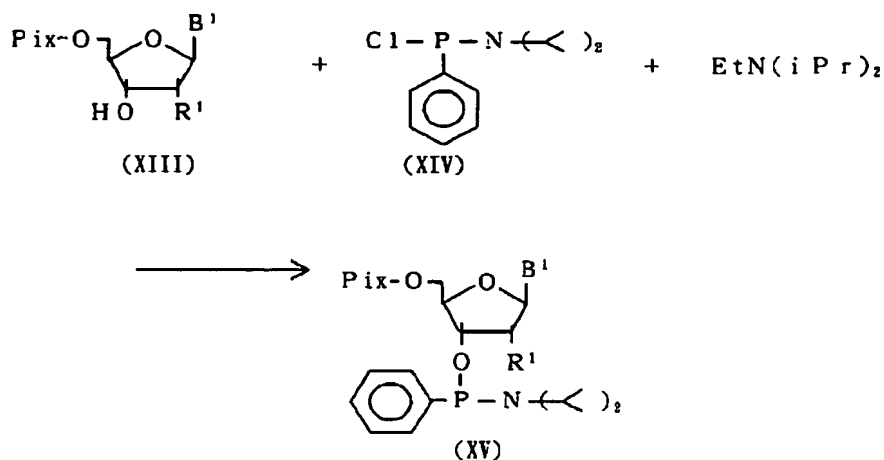
【0209】であるオリゴヌクレオチド誘導体（I b）なども同様にして得ることができる。

（1）X⁶がOH基またはSH基であるオリゴヌクレオチド誘導体（I b-1）

（すなわち、X⁶がフェニル基で、X⁷がOH基またはSH基であるオリゴヌクレオチド誘導体（I b））の製造法

【0210】
【化107】

95
反応式 (a)



【0211】〔式中、Pixはフェニルキサンテニル基を示し、 $\text{EtN}(\text{iPr})_2$ はエチルジイソプロピルアミンを示す。〕

反応式 (a) は、化合物 (XIII) の水酸基をフェニル基がリン原子に直接結合しているリン酸化剤 (XIV) と反応させ、化合物 (XV) を得るものである。化合物 (XIII) 1 ミリモルに対して 1 ~ 2 ミリモル程度のリン酸化剤 (XIV) と 2 ~ 5 ミリモル程度のエチルジイソプロピルアミンを用い、溶媒としてハロゲン化炭化水素類 (例、塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素)、エーテル類 (例、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン)、芳香族炭化水素類 (例、ベンゼン、トルエン)、アセトニトリル、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アルコール類 (例、メタノール、エタノール) を用いることができるが、この中でも望ましくは塩化メチレンを用い、通常反応温度 - 20℃から

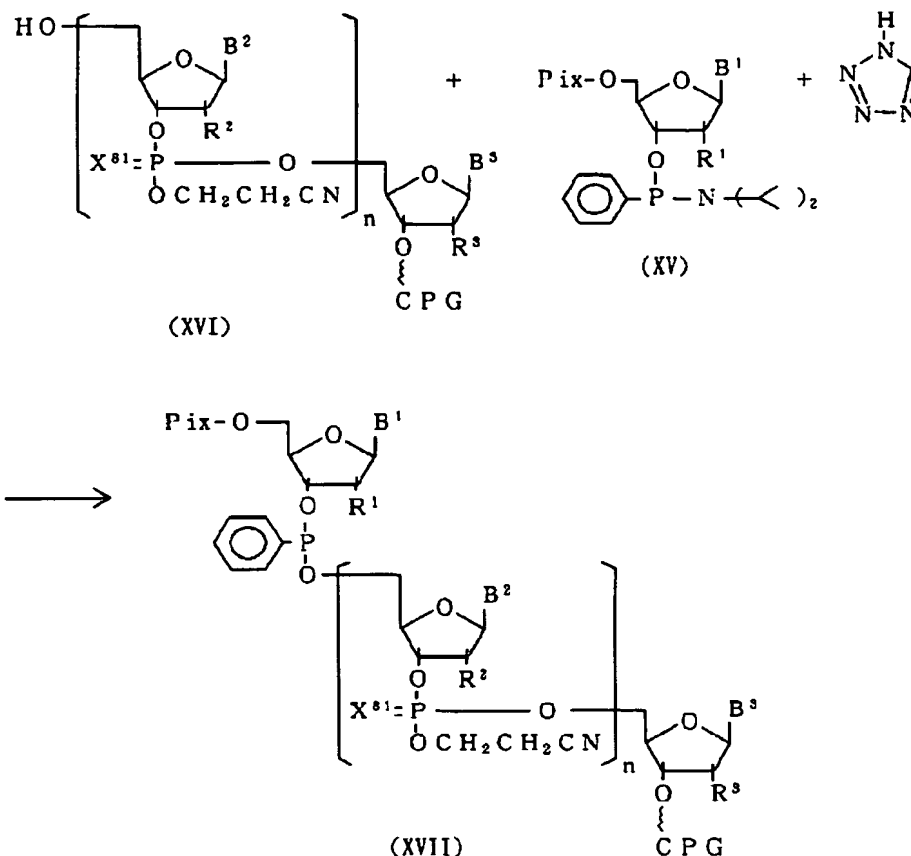
70℃程度、望ましくは15℃から35℃程度で、通常反応時間0.5時間から5時間程度、望ましくは1時間から2時間程度反応させて化合物 (XV) を得る。原料化合物 (XIII) および (XIV) はそれ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって製造することができ、公知文献 (M. D. Matteucci et al., *Tetrahedron Lett.*, vol. 21, 719(1980). S. L. Beaucage et al., *Tetrahedron Lett.*, vol. 22, 1859(1981). L. J. McBride et al., *Tetrahedron Lett.*, vol. 24, 245(1983). B. C. Froehner et al., *Nucleic Acids Res.*, vol. 14, 5399(1986). B. C. Froehner et al., *Tetrahedron Lett.*, vol. 27, 4051(1986). E. Uhlman et al., *Chemical Reviews*, vol. 90, No. 4, 543(1990).) の方法にしたがって製造することができる。

【0212】

【化108】

97
反応式 (b)

98



【0213】〔式中、 X^{81} はOまたはSを示し、 n の繰返しにおいてそれぞれ同一または異なっている。〕

反応式 (b) は、反応式 (a) で得られた化合物 (XV) と、適当に保護されている (例えば、P に隣接する O がシアノエチル基で保護されている) ヌクレオチド誘導体またはオリゴヌクレオチド誘導体 (XVI) との反応である。化合物 (XVI) 1 マイクロモルに対して 20 から 100 マイクロモル程度のフェニルホスホナイト構造をもつヌクレオチド誘導体 (XV) と 20 から 100 マイクロモル程度の 1-H テトラゾールを用い、溶媒としてハロゲン化炭化水素類 (例、塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素)、エーテル類 (例、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン)、芳香族炭化水素類 (例、ベンゼン、トルエン)、アセトニトリル、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アルコール類 (例、メタノール、エタノール) を用いることができるが、この中でも望ましくはアセトニトリルを用い、通常反応温度 -20℃ から 70℃ 程度、望ましくは 15℃ か

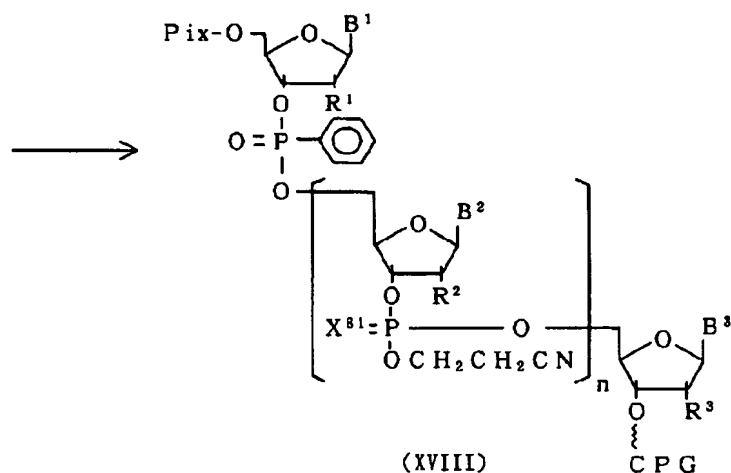
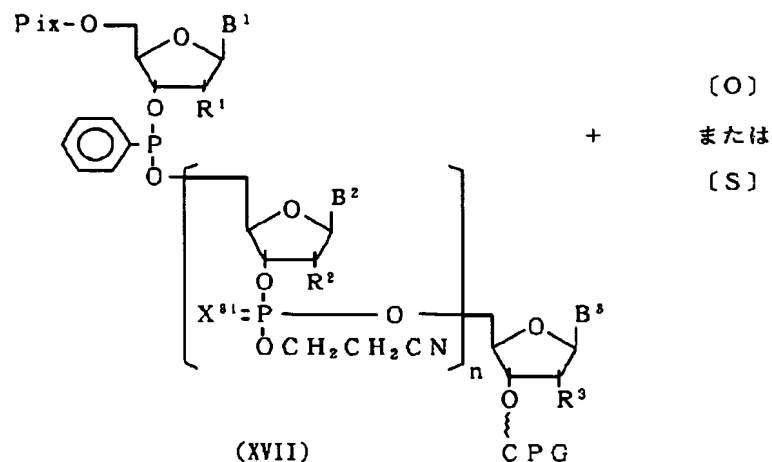
30 ら 35℃ 程度で、通常反応時間 3 分から 30 分間程度、望ましくは 5 分から 20 分間程度反応させて化合物 (XVII) を得る。原料化合物である 1-H テトラゾールは、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって製造することができる。原料化合物である適当に保護されていてもよいヌクレオチド誘導体またはオリゴヌクレオチド誘導体 (XVI) は、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって製造することができる。すなわち、一般のヌクレオチド誘導体を用いてオリゴヌクレオチドを合成する方法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach" M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがって行うことができる。一連のヌクレオチド鎖伸長反応はマニュアル法、自動合成機を用いる方法のいずれによっても可能であるが、自動合成機で行うことにより操作法の簡便化、また合成の正確性の点から自動合成機を用いる方法が望ましい。

【0214】

【化109】

99
反応式 (c)

100



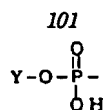
【0215】反応式(c)は、反応式(b)で得られた化合物(XVII)を酸化または硫化して化合物(XVIII)を得るものである。化合物(XVII)1マイクロモルに対して酸化剤(例、mCPBA、NBS、NBA、I₂、DMSO-DCCなど、好ましくはI₂)または硫化剤(例、ジ(フェニルアセチル)ジスルフィド、3-H, 1, 2-ベンゾジチオール-3-オン、テトラエチルチウラムジスルフィド、ジベンゾイルテトラスルフィド、ジベンゾイルトリスルフィド、ジベンゾイルジスルフィドなど、好ましくはテトラエチルチウラムジスルフィドなど)を通常20マイクロモルから100マイクロモル程度加えて、通常反応温度-20℃から70℃程度、望ましくは15℃から35℃程度である。反応時間は酸化反応の場合は通常反応時間30秒間から100分間程度、望ましくは30秒間から5分間程度であり、硫化反応の場合は、通常反応時間30秒間から100分間程度、望ましくは30秒間から20分間程度である。

【0216】そして、得られた化合物(XVIII)の保護基を選択的に除去することによって、X⁶がフェニル基で、X⁷がOH基またはSH基であるオリゴヌクレオチド誘導体(Ib)を製造することができる。保護基の除去方法としてはそれ自体公知またはそれに準じる方法が用いられるが、例えばまずアンモニア/ピリジン(5:1)溶液を60℃で6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと、リン酸基、塩基部分、糖部分の保護基の除去を行う。すべての保護基を除いた後、逆相HPLCなどを用いて精製することができる("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach" M. J. Gait(ed), IRL PRESS, (1984).)。さらに、上記の製造法においてPix基を除去した後に、他の保護基、例えば式

【0217】

【化110】

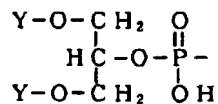
50



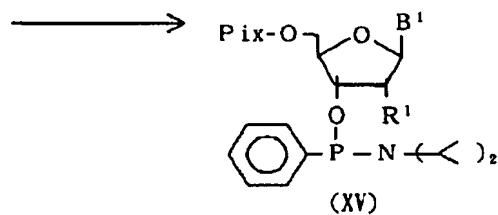
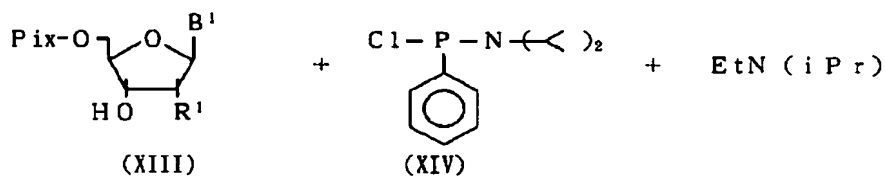
【0218】または

【0219】

【化111】



【0220】〔式中、YおよびX'は前記と同意義を示す*
反応式(d)〕



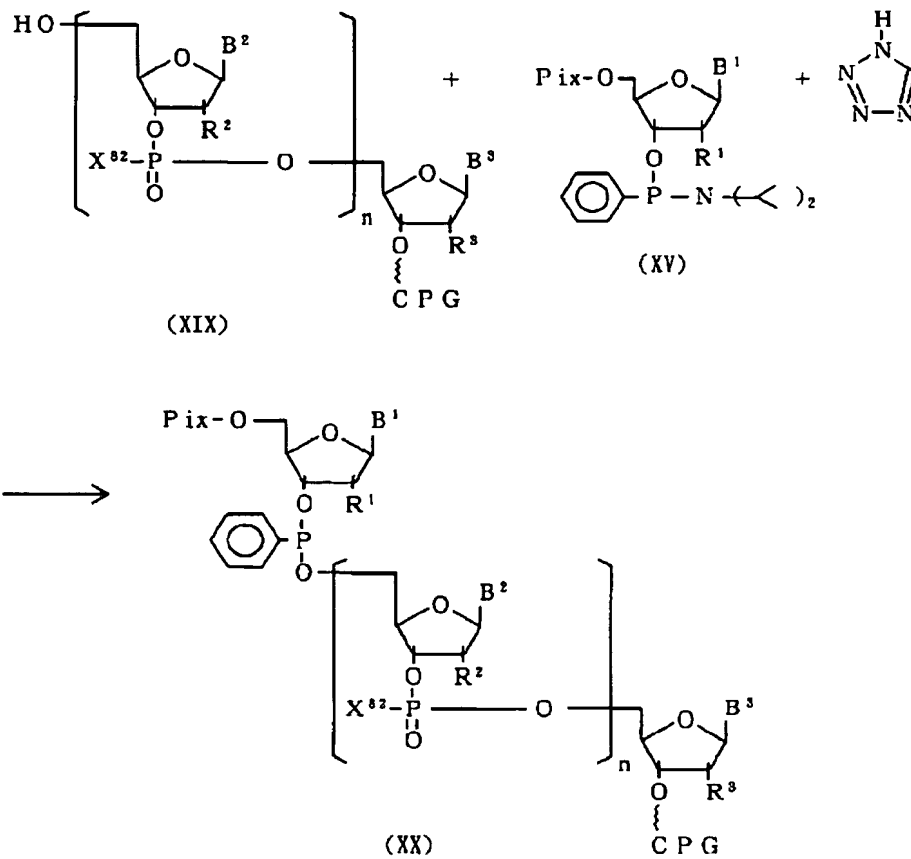
【0223】〔式中、Pixはフェニルキサンテニル基
を示し、EtN(iPr)₂はエチルジイソプロピルア
ミンを示す。〕

【0224】

【化113】

103
反応式 (e)

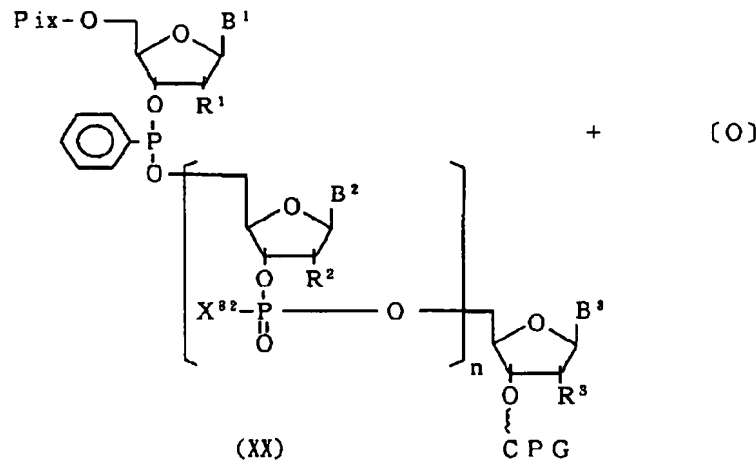
104



【0225】〔式中、 X^{82} は C_{1-5} アルキル基、 C_{1-5} アルコキシ基、 C_{1-5} モノアルキルアミノ基または置換されていてもよい芳香環基を示し、 n の繰返しにおいて
30 それぞれ同一または異なってもよい。〕
【0226】
【化114】

105
反応式 (f)

106

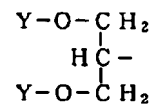


【0227】原料化合物である適当に保護されていてもよいヌクレオチド誘導体またはオリゴヌクレオチド誘導体 (XIX) は、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって製造することができる。すなわち、一般のヌクレオチド誘導体を用いてオリゴヌクレオチドを合成する方法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach" M. J. Gait(ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがって行うことができる。一連のヌクレオチド鎖伸長反応はマニュアル法、自動合成機を用いる方法のいずれによっても可能であるが、自動合成機で行うことにより操作法の簡便化、また合成の正確性の点から自動合成機を用いる方法が望ましい。反応式 (d) は上記反応式 (a) と、反応式 (e) は反応式 (b) と、反応式 (f) は反応式 (c) と同様にして行うことができる。そして、得られた化合物 (XXI) の保護基を選択的に除去することによって、X⁸² がフェニル基で、X' が C₁₋₅ アルキル基、C₁₋₅ アルコキシ基、C₁₋₅ モノアルキルア

ミノ基または置換されていてもよい芳香環基であるオリゴヌクレオチド誘導体 (I b) を製造することができる。保護基の除去方法は前記と同様の方法が用いられる。さらに、上記の製造法において P i x 基を除去した後に、他の保護基を自体公知あるいはそれに準じる方法に従って導入することができる。前述したように本発明の糖誘導体 (A) および糖誘導体 (B) はそれ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができるが、本発明の糖誘導体 (A) の中で、Q が式

【0228】

【化115】

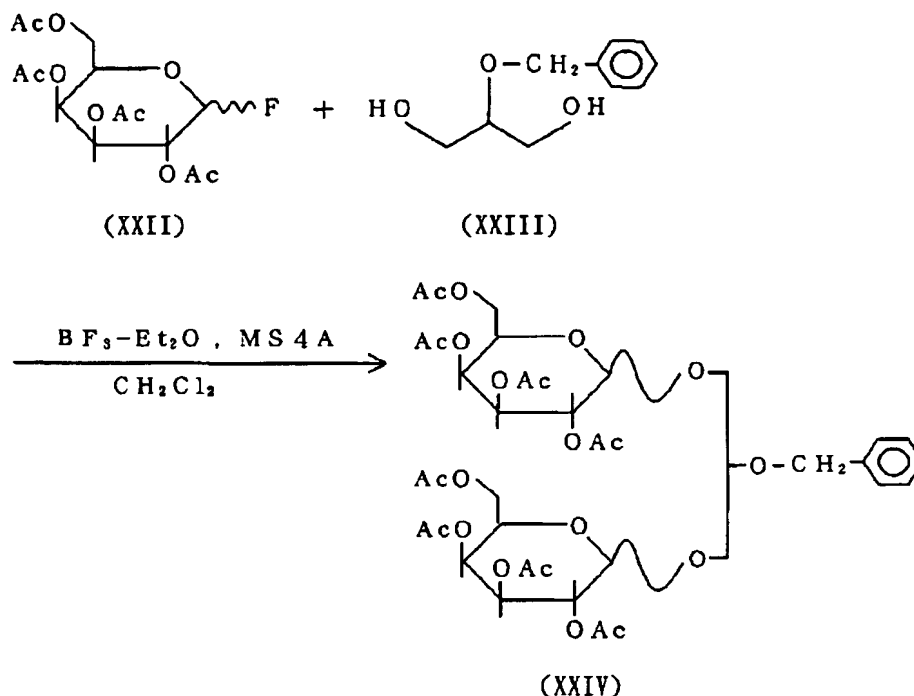


【0229】で表される分岐したオリゴ糖を有する糖誘導体の製造法を以下に具体的に説明する。

【0230】

* * 【化116】

反応式 (a)



【0231】反応式 (a) はベンジル基で保護したグリセロール誘導体 (XXIII) の水酸基を、アセチル基で保護したフッ化ガラクトース誘導体 (XXII) と反応させ、化合物 (XXIV) を得るものである。化合物 (XXIII) 1 ミリモルに対して2~5ミリモル程度のアセチル基で保護したフッ化ガラクトース誘導体を、ルイス酸 ($\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ 、 SnCl_4 、 $\text{Cp}_2\text{HfCl}_2\text{-AgClO}_4$ 、 $\text{Cp}_2\text{ZrCl}_2\text{-AgClO}_4$ 、この中でも好ましくは $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ 。Cpはシクロペンタジエニルを示す。) を3~12ミリモル程度とモレキュラーシーブを用い、溶媒としてハロゲン化炭化水素類 (例、塩化メチレン、クロロホルム)、エーテル類 (例、ベンゼン、トルエン)、アセトニトリル、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アルコール類 (例メタノール、エタノール) を用いることができるが、この中でも望ましくは塩化メチレンを用い、通常反応温度-78℃~80℃程度、望ましくは15℃~35℃程度で、通常反応時間0.5時間~5時間程度、望ましくは1時間から2時間程度反応させて化合物 (XXIV) を得る。

【0232】原料化合物 (XXII) および (XXIII) は、

それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって製造することができる。例えば、原料化合物 (XXII) は公知文献(K. Suzuki et al., Tetrahedron Lett., vol.29, 3571 (1988). K. Suzuki et al., Tetrahedron Lett., vol.29, 3575 (1988). K. Suzuki et al., Tetrahedron Lett., vol.30, 6879 (1989). K. Suzuki et al., Tetrahedron Lett., vol.30, 4853 (1989). T. Ogawa et al., Tetrahedron Lett., vol.31, 1597 (1990). T. Ogawa et al., Tetrahedron Lett., vol.33, 6343 (1992). T. Ogawa et al., Tetrahedron Lett., vol.33, 7907 (1992). T. Ogawa et al., Tetrahedron Lett., vol.34, 1061 (1993). K. C. Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc., vol.112, 3693 (1990). K. C. Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc., vol.114, 8701 (1992).原料化合物 (XXIII) は公知文献 ("PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS" Second Edition, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, Inc. (1991).)の方法にしたがって製造することができる。

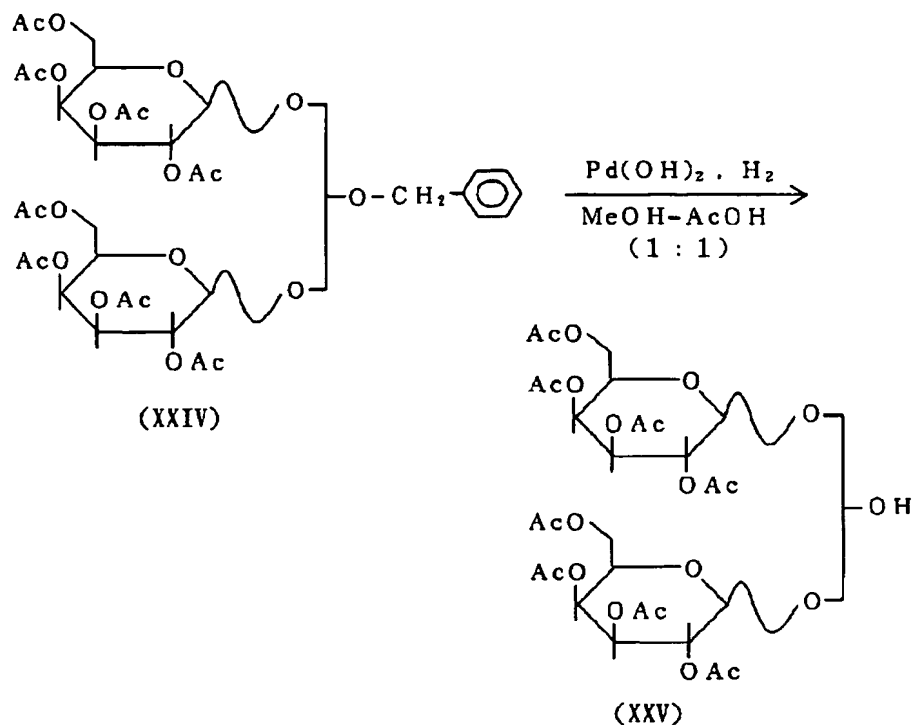
【0233】

【化117】

109

110

反応式 (b)



【0234】反応式 (b) は化合物 (XXIV) のベンジル基を Pd 存在下接触還元によって脱保護し、化合物 (XXV) を得るものである。化合物 (XXIV) 1 ミリモルに対して、10% Pd(OH)₂ 30mg ~ 60mg を加え、溶媒としてハロゲン化炭化水素類 (例、塩化メチレン、クロロホルム)、エーテル類 (例、ベンゼン、トルエン)、アセトニトリル、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、酢酸エチル、アルコール類 (例メタノール、エタノール) を用いることができる

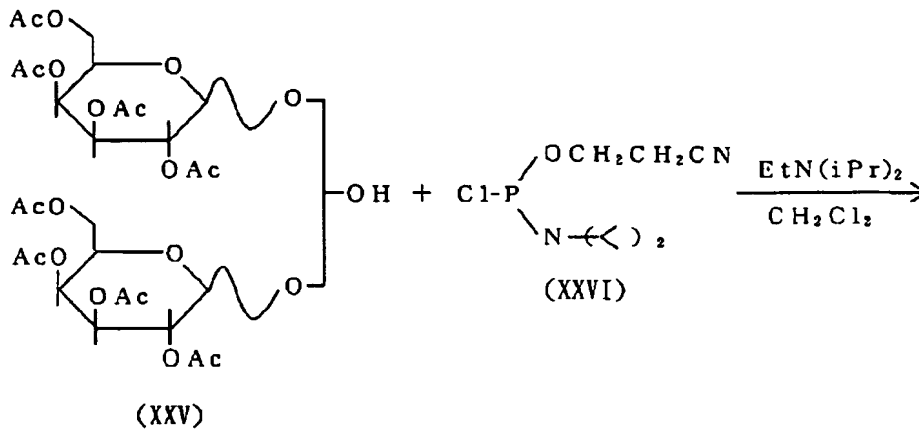
30

が、この中でも望ましくはメタノール-酢酸エチル (1:1) を用い、中圧水素添加 (3.5 kg/cm²) により、通常反応温度 -78℃ ~ 80℃ 程度、望ましくは 15℃ ~ 35℃ 程度で、通常反応時間 1 時間 ~ 24 時間程度、望ましくは 3 時間から 15 時間程度反応させて化合物 (XXV) を得る。

【0235】

【化118】

111
反応式 (c)

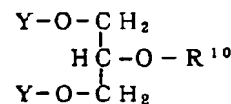


【0236】反応式 (c) は化合物 (XXV) の水酸基を P に隣接する O をシアノエチル基で保護されたリン酸化剤 (XXVI) と反応させ、化合物 (XXVII) を得るものである。化合物 (XXV) 1 ミリモルに対して 1 から 2 ミリモル程度のリン酸化剤 (XXVI) と 2 ～ 5 ミリモル程度のエチルジイソプロピルアミンを用い、溶媒としてハロゲン化炭化水素類 (例、塩化メチレン、クロロホルム)、エーテル類 (例、ベンゼン、トルエン)、アセトニトリル、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、酢酸エチル、アルコール類 (例メタノール、エタノール) を用いることができるが、この中でも望ましくは塩化メチレンを用い、通常反応温度 $-20^{\circ}\text{C} \sim 70^{\circ}\text{C}$ 程度、望ましくは $15^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$ 程度で、通常反応時間 0.5 時間 ～ 5 時間程度、望ましくは 1 時間から 2 時間程度反応させて化合物 (XXVII) を得る。原料化合物 (XXVI) は公知文献 (M. D. Matteucci et al., Tetrahedron Lett., vol. 21, 719 (1980). S. L. Beaucage et al., Tetrahedron Lett., vol. 22, 1859, (1981). L. J. McBride et al., Tetrahedron Lett., vol. 24, 245, (1983). B. C. Froehner et al., Nucleic Acids Res., vol. 14, 5399 (1986). B. C. Froehner et al., Tetrahedron Lett., vol. 27, 469 (1986). E. Uhlman et al.,

Chemical Reviews, vol. 90, No. 4, 543 (1990).) の方法にしたがって製造することができる。上記の製造法に使用される原料化合物 (XXV) を包含する式

【0237】

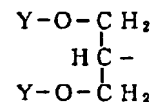
【化119】



【0238】〔式中、Y は前記と同意義を示し、 R^{10} は水素原子またはベンジル基を示す。〕で表される糖誘導体も新規な化合物であり、Q が

【0239】

【化120】



【0240】である糖誘導体 (A) および (B) の製造中間体として有用である。糖誘導体 (C) において、Y で表される糖残基の糖としては、水酸基が C_{1-6} アルキルカルボニル基 (例えば、アセチル基など) などで置換

されていてもよい単糖類（例えば、ガラクトース、マルトースグルコースなど、好ましくはガラクトースなど）が好適である。具体的には、実施例61または62で製造できるものなどが好適である。

【0241】かくして得られるオリゴヌクレオチド誘導体（I）、（Ia）および（Ib）が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I）、（Ia）および（Ib）の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I）、（Ia）、（Ib）（以下、オリゴヌクレオチド誘導体（Ia）およびオリゴヌクレオチド誘導体（Ib）を含めて、オリゴヌクレオチド誘導体（I）と称する）またはその塩は、各種疾病（例えば、悪性腫瘍、ウイルス疾病、炎症、PTCA後の血管再狭窄など）を引き起こす原因となる遺伝子のDNAあるいはmRNAに対する相補性によって、生体内で有害なタンパク質を産生する遺伝子の発現を抑制したり、また有害なタンパク質を産生する遺伝子の発現に関与するタンパク質（例えば、プロモーターに結合して転写を開始させるタンパク質など）を産生する遺伝子の発現を抑制したりすることができる。例えば、（1）悪性腫瘍細胞中の悪性腫瘍遺伝子の発現を阻害する、（2）ウイルスに由来しているウイルス遺伝子の発現を抑制する、（3）炎症を引き起こす原因となるタンパク質を産生する遺伝子の発現を抑制する、（4）悪性腫瘍の化学療法の際に問題となる薬剤耐性遺伝子の発現を抑制することができる、（5）PTCA後の血管再狭窄に関わる細胞増殖因子の産生を阻害することができるので、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、薬剤耐性遺伝子などの特定遺伝子の発現を制御する薬剤として用いることができる。また、これらの化合物は、試験される条件に影響を与える他の化合物を探索するための薬剤スクリーニングに用いることができる。例えば、腫瘍がN-rasの発現に由来している腫瘍細胞を見るとき、N-rasをターゲットとするオリゴヌクレオチド化合物（すなわち、mRNA翻訳開始部位のようなN-rasの限界部に対するアンチセンス化合物）を用いることができ、また腫瘍に影響を与えるような他の化合物をスクリーニングすることができる。このように種々の薬剤を選択および開発することができる。特に、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（Ia）は、いわゆるアンチセンス・オリ

ゴヌクレオチド誘導体として使用することができる。生体内においては、特定遺伝子の発現の結果、その遺伝子産物が原因となって生じる疾病は数多く知られており、その例として以下のようなものがある。例えばプロトオンコジーン（例ras）への変換、オンコジーンとしての過剰発現（例neu/erb. B2）などがある。病原性を持つウイルス遺伝子あるいは腫瘍遺伝子は、細胞内に内在しているもの（例えばrasのような構造遺伝子）と、外来性と呼ばれる細胞外からのウイルスに感染した結果によるものと2種類に大別されており、これらの遺伝子の発現が、ウイルス病の発症または正常細胞の異常増殖を引き起こされるひとつの要因となっていることが明らかにされてきている。また、ICAM-1などの遺伝子が発現することにより、産生されてくる接着タンパク質が炎症を引き起こす原因となっている。さらに、直接的にはそれらの遺伝子の発現が病因になっているわけではないが、悪性腫瘍の化学療法の際に必ず問題となる抗腫瘍剤に対して生体が薬剤耐性を獲得してしまい、その結果完全治癒を困難にしているということなどは、薬剤耐性遺伝子の発現が間接的な原因であると考えられる。したがって、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩は、このような疾病を引き起こす原因となる遺伝子の活性化または発現を制御することによって、温血哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ネズミ、ブタ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ、ヒトなど）に対する安全で低毒性の疾病治療剤（例えば、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤など）として有効である。また、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩の細胞膜透過性や脂溶性などを高めるために、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩をリボソーム（例えば、リボフェクチンなど）などで包括して使用することができる。特に、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（Ia）またはその塩をリボソーム（例えば、リボフェクチンなど）で包括するのが好ましい。

【0242】本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩を上記の薬剤として使用する場合は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴム

のような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（例えばエタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート80、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。投与量は、対象疾患の種類、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは1.0～50 mg、より好ましくは1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01 mg～30 mg程度、好ましくは0.1～20 mg程度、より好ましくは0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の哺乳動物の場合も、kgあたりに換算した同様の投与量で投与される。

【0243】また、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩は、DNAに対して優れた相補性を有しているため、DNAのスクリーニングのためのプローブとしても用いることができる。一般にDNAのスクリーニングには、適当なオリゴヌクレオチドを合成し、それをプローブとして目的とするDNAをスクリーニングする方法が用いられる。しかし、合成オリゴヌクレオチドのDNAに対する相補性が低いとスクリーニング効率が低下する等の欠点がある。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩は、DNAに対して優れた相補性を有しているため、効率の良いスクリーニング

を行うための材料としても有効である。さらには、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩は、5'末端に糖誘導体等を有しているため、対象とするDNAに相補的に結合させた後、糖分析を行うことによって、対象DNAの検出を行うこともできる。また本発明のオリゴヌクレオチド誘導体（I）またはその塩は、他のオリゴヌクレオチドの代りにプローブとして用いられ、スクリーニングに用いることができる。

【0244】

10 【実施例】本発明を参考例、実施例および試験例を挙げ、さらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【参考例1】

ICAM-1 アンチセンスホスホロチオエート：

Ts Gs Gs Gs As Gs Cs Cs As Ts As Gs Cs Gs Gs C（配列番号：31）の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり200マイクロモル導入されたCPG500ミリグラム（100マイクロモル）を、自動合成機（ABI社製のDNA synthesizer Model 381A）にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

（1）3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

30 （2）アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

（3）アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

（4）0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

（5）0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

（6）0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

40 （7）アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。（1）の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法（"Oligonucleotide

Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のICAM-1アンチセンスホスホロチオエート: T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅Cを合成した。

収量; 893.3 OD

λ_{\max} ; 257.4 nm

λ_{\min} ; 230.2 nm

[0245]

【参考例2】

ICAM-1アンチセンスホスホロチオエートの逆配列ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド:

C₅G₅G₅A₅G₅C₅G₅A₅T₅A₅C₅C₅G₅A₅G₅G₅T (配列番号: 36) の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG500ミリグラム(10マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出し

た各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のICAM-1アンチセンスホスホロチオエートの逆配列ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド: C₅G₅G₅A₅G₅C₅G₅A₅T₅A₅C₅C₅G₅A₅G₅G₅T

収量; 719.1 OD

λ_{\max} ; 257.1 nm

λ_{\min} ; 230.9 nm

[0246]

【参考例3】

N-ベンゾイルガラクトサミンホスフェートが結合したホスホロチオエート逆配列オリゴヌクレオチド:

(N-BzGalPO)-C₅G₅G₅A₅G₅C₅G₅A₅T₅A₅C₅C₅G₅A₅G₅G₅T (配列番号: 36) の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG500ミリグラム(10マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグア

ノシン誘導体を結合させるためには上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のシチジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例17で合成したN-ベンゾイルガラクトサミン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)(5)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から

(7)を繰り返しておこなう。
(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたシチジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例17で合成した0.2MN-ベンゾイルガラクトサミンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

以上の操作により、逆配列オリゴヌクレオチドの5'末端にN-ベンゾイルガラクトサミン誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法

("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait(ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のN-ベンゾイルガラクトサミンホスフェートが結合したホスホロチオエート逆配列オリゴヌクレオチド:(N-BzGalPO)-C₅G₅G₅A₅G₅C₅G₅A₅T₅A₅C₅C₅G₅A₅G₅G₅Tを合成した。

収量; 70.5 OD

λ_{max}; 257.2 nm

λ_{min}; 229.6 nm

[0247]

【参考例4】

部分的にメチルホスホネート結合を導入したホスフェート逆配列オリゴヌクレオチド:

C₅, G₅, GAGCGATACCGAGG₅, G₅, T (配列番号: 38)の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンメチルホスホアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトル

につめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンメチルホスホアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたグアノシンメチルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンメチルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるためには、グアノシンホスホアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンメチルホスホネート誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5', 3'末端2塩基にメチルホスホネート結合を導入したホスフェート逆配列オリゴヌクレオチド:C₅, G₅, GAGCGATACCGAGG₅, G₅, Tを合成した。

収量; 71.0 OD

λ_{max}; 256.4 nm

121

 λ_{\min} ; 234.0 nm

【0248】

【参考例5】

部分的にメチルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

T₁, G₁, GGAGCCATAGCGAG₁, G₁, C (配列番号: 34) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンメチルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンメチルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンメチルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンメチルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンメチルホスホネート誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mアデノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルア

122

ルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRLPRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5', 3'末端2塩基にメチルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: T₁, G₁, GGAGCCATAGCGAG₁, G₁, Cを合成した。

収量: 17.0 OD

λ_{\max} ; 255.6 nm

λ_{\min} ; 229.8 nm

【0249】

【実施例1】

1,2,3,4-0-テトラアセチルガラクトース-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

1,2,3,4-0-テトラアセチルガラクトース(0.87g, 2.49mmol)を無水ピリジン2ml×3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml×3回、無水塩化メチレン2ml×3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(2.17ml, 12.45mmol)と、N, N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロクロリド(1.11ml, 4.98mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン)で精製し、目的物の1,2,3,4-0-テトラアセチルガラクトース-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロアミダイト(1.17g, 2.14mmol, 86%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 6.34(m, 1H, H-1), 5.67-5.30(m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.34-4.18(m, 3H, H-5, H-6), 3.90-3.56(m, 2H, methine of isopropyl), 2.65(m, 4H, methylene of cyanoethyl), 2.14-1.99(m, 12H, methyl of acetyl), 1.31-1.19(m, 12H, methyl of isopropyl)ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 152.2, 152.3, 153.6, 153.7 ppm

【0250】

【実施例2】

1,2,3,4-0-テトラアセチルマンノース-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロアミダ

イトの合成

1,2,3,4-0-テトラアセチルマンノース (0.97 g, 2.78 mmol) を無水ピリジン 2 ml × 3 回共沸脱水をした後、無水トルエン 2 ml × 3 回、無水塩化メチレン 2 ml × 3 回共沸をおこなう。その後塩化メチレン 5 ml に溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン (2.42 ml, 13.90 mmol) と、N, N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロクロリド (1.24 ml, 5.56 mmol) を加え、室温で 1 時間反応させた後、塩化メチレン 50 ml を加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 50 ml で 3 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/塩化メチレン = 80 : 20, 2% トリエチルアミン) で精製し、目的物の 1,2,3,4-0-テトラアセチルマンノース-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロアミダイトを (1.25 g, 2.28 mmol, 82%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 6.08 (d, 1H, H-1), 5.36-5.25 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 3.87-3.77 (m, 3H, H-5, H-6), 3.64 (m, 2H, methine of isopropyl), 2.66 (m, 4H, methylene of cyanoethyl), 2.19-2.01 (m, 12H, methyl of acetyl), 1.30-1.16 (m, 12H, methyl of isopropyl) ppm

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ 149.6, 149.7, 150.2, 150.3 ppm

[0251]

【実施例3】

ガラクトースが結合したホスホロチオエートオリゴヌクレオチド:

(GAL) - T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅C (配列番号: 31) の合成

N-4 アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基を DMT r 基で保護されたシチジン誘導体が 1 グラムあたり 20 マイクロモル導入された CPG 50 ミリグラム (1 マイクロモル) を、自動合成機 (ABI 社製の DNA synthesizer Model 381 A) にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを 0.2 M の濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂ 処理を 60 秒間おこない、5'-DMT r 基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルにより CPG を洗浄する。

(3) アルゴンガスにより CPG を乾燥させる。

(4) 0.2 M グアノシンホスホロアミダイトユニットと 0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を 5 分間おこなう。

(5) 0.5 M テトラエチルチウラムジスルフィド/ア

セトニトリルにより硫黄化反応を 15 分間おこなう。

(6) 0.25 M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を 30 秒間反応させることにより未反応の 5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作で CPG 上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に 0.2 M の濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1) および (4) については下記の通りにする以外は上記の操作 (1) から (7) を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂ 処理を 60 秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の 5'-DMT r 基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2 M グアノシンホスホロアミダイトユニットと 0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を 5 分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1) の操作で遊離してきた DMT r を比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は 99% 以上であった。18 量体目のチミジル酸を縮合させた後、5' 末端に先の実施例 1 で合成したガラクトース誘導体を結合させるためには、同様に 0.2 M の濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1) および (4) については下記の通りにする以外は上記の操作 (1) から (7) を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂ 処理を 60 秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の 5'-DMT r 基を除去する。

(4) 実施例 1 で合成した 0.2 M ガラクトースホスホロアミダイトユニットと 0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を 5 分間おこなう。

以上の操作により、オリゴヌクレオチドの 5' 末端にガラクトース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中の CPG を取り出してから、これをアンモニア/ピリジン (5:1) 溶液で 60℃、6 時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相 HPLC (μ Bondasphäre C₁₈) を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のガラクトースが結合したホスホロチオエートオリゴヌクレオチド: (GAL) - T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅C を合成した。

収量; 43.65 OD

λ_{max} ; 256.3 nm

125

 $\lambda_{\text{min}}; 229.3 \text{ nm}$

【0252】

【実施例4】

マンノースが結合したホスホロチオエートオリゴヌクレオチド:

(MAN) - T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅C (配列番号: 31) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた

126

後、5'末端に先に実施例2で合成したマンノース誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例2で合成した0.2Mマンノースホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作により、オリゴヌクレオチドの5'末端にマンノース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のマンノースが結合したホスホロチオエートオリゴヌクレオチド: (MAN) - T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅Cを合成した。

収量; 33.47 OD

$\lambda_{\text{max}}; 256.3 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{min}}; 229.3 \text{ nm}$

【0253】

【実施例5】

1-0-n-オクチル-2,3,4-O-トリベンゾイルグルコシド-6-O-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

1-0-n-オクチル-2,3,4-O-トリベンゾイルグルコシド(1.22g, 2.02mmol)を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(1.76ml, 10.10mmol)と、N,N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロクロリド(0.90ml, 4.04mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン)で精製し、目的物の1-0-n-オクチル-2,3,4-O-トリベンゾイルグルコシド-6-O-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト(1.42g, 1.78mmol, 88%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.02-7.80(m, 6H, o-H of benzoyl), 7.55-7.26(m, 9H, m, p-H of benzoyl), 5.82(d, 1H, H-1), 5.60-5.29, 5.60-5.30(m, 3H, H-2, 3, 4), 3.95-3.77(m, 3H, H-5, H-6), 3.59-3.50(m, 2H, CH of isopropyl), 2.58-2.55(m, 2H, CH_2 of cyanoethyl), 1.17-1.09(m, 20H, CH_3 of isopropyl, CH_3 of octyl), 0.83(t, 3H, CH_3 of octyl)ppm

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ 149.57, 149.65, 149.68, 149.74 ppm

【0254】

【実施例6】

n-オクチルグルコシドが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(n-oct-Glc) - T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅C (配列番号: 31) の合成
N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存

しておく。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例5で合成したn-オクチルグルコシド誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例5で合成した0.2Mn-オクチルグルコシドホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にn-オクチルグルコシド誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait(ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のn-オクチルグルコシドが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (n-oct-Glc) - T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅Cを合成した。

収量; 38.7 OD

λ_{max} ; 256.5 nm

λ_{min} ; 229.1 nm

【0255】

【実施例7】

1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシド-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシド(0.76g, 1.22mmol)を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(1.06ml, 6.10mmol)と、N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロクロリド(0.50ml, 2.44mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン

50 ml を加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50 ml で3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン）で精製し、目的物の1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシド-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト（0.82 g, 1.00 mmol, 82%）を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.97-7.93(m, 6H, o-H of benzoyl), 7.52-7.26(m, 9H, m, p-H of benzoyl), 5.82(d, 1H, H-1), 5.61-5.45, 4.82-4.75(m, 3H, H-2, 3, 4), 3.85-3.78(m, 3H, H-5, H-6), 3.68-3.50(m, 2H, CH of isopropyl), 2.61-2.54(m, 2H, CH₂ of cyanoethyl), 1.29-1.10(m, 20H, CH₃ of isopropyl, CH₂ of octyl), 0.90-0.86(t, 3H, CH₃ of octyl) ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 149.51, 149.91, 151.18 ppm

【0256】

【実施例8】

n-オクチルチオグルコシドが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(n-oct-SGlc)-T₃G₃G₃G₃A₃G₃C₃C₃A₃T₃A₃G₃C₃G₃A₃G₃G₃C (配列番号: 31) の合成
N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム（1マイクロモル）を、自動合成機（ABI社製のDNA synthesizer Model 381A）にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホ

チオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例7で合成したn-オクチルチオグルコシド誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例7で合成した0.2Mn-オクチルチオグルコシドホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にn-オクチルチオグルコシド誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のn-オクチルチオグルコシドが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (n-oct-SGlc)-T₃G₃G₃G₃A₃G₃C₃C₃A₃T₃A₃G₃C₃G₃A₃G₃G₃Cを合成した。

収量; 14.7 OD

λ_{max}; 256.9 nm

λ_{min}; 229.6 nm

【0257】

【実施例9】

1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド-6-0-(N,N-ジイソプロピルアミノ)フェニルホスホノアミ

ダイトの合成

1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド (1.15g, 1.91mmol) を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン (1.66ml, 9.54mmol) と、クロロ-N,N-ジイソプロピルアミノフェニルホスホノアミダイト (0.93g, 3.82mmol) を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2% トリエチルアミン) で精製し、目的物の1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド-6-0-(N,N-ジイソプロピルアミノ) フェニルホスホノアミダイト (1.01g, 1.24mmol, 65%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.98-7.82(m, 1H, o-H of benzoyl, phenyl), 7.53-7.24(m, 9H, m, p-H of benzoyl), 5.93-5.83(s, 1H, H-1), 4.84-4.80, 5.54-5.45(m, 3H, H-2, 3, 4), 3.92-3.77(m, 3H, H-5, 6), 3.56-3.47(m, 2H, CH of isopropyl), 1.38-1.22(m, 20H, CH₃ of isopropyl, CH₂ of octyl), 0.86-0.80(t, 3H, CH₃ of octyl) ppm ³¹P-NMR (CDCl₃) δ 120.86, 121.95 ppm

【0258】

【実施例10】

n-オクチルグルコシドフェニルホスホネートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (n-oct-GlcPh)-TsGsGsGsAsGsCsCsAsTsAsGsCsGsAsGsGsC (配列番号: 31) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム (1マイクロモル) を、自動合成機 (ABI社製のDNA synthesizer Model 381A) にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこ

なう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例9で合成したn-オクチルグルコシドフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)(5)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例9で合成した0.2M n-オクチルグルコシドフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にn-オクチルグルコシドフェニルホスホネート誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン (5:1) 溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC (μBondaspher

e C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のn-オクチルグルコシドフェニルホスホネートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (n-oct-GlcPh)-T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅Cを合成した。

収量; 52.2 OD

λ_{max}; 256.3 nm

λ_{min}; 229.3 nm

【0259】

【実施例11】

1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシド-6-0- (N,N-ジイソプロピルアミノ) フェニルホスホノアミダイトの合成

1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシド (0.84g, 1.35mmol) を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン (1.17ml, 6.75mmol) と、クロロ-N,N-ジイソプロピルアミノフェニルホスホノアミダイト (0.66g, 2.69mmol) を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン) で精製し、目的物の1-0-n-オクチル-2,3,4-0-トリベンゾイルチオグルコシド-6-0- (N,N-ジイソプロピルアミノ) フェニルホスホノアミダイト (0.51g, 0.62mmol, 46%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.97-7.80(m, 11H, o-H of benzoyl, phenyl), 7.79-7.19(m, 9H, m-, p-H of benzoyl), 5.91(d, 1H, H-1), 5.58-5.46, 4.85-4.79, 4.07-4.00(m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.33-3.28(m, 2H, CH of isopropyl), 1.57-1.00(m, 20H, CH₃ of isopropyl, CH₂ of octyl), 0.85(t, 3H, CH₃ of octyl)ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 119.68, 122.60 ppm

【0260】

【実施例12】

n-オクチルチオグルコシドフェニルホスホネートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(n-oct-SGlcPh)-T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅C (配列番号: 31) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム (1マイクロモル) を、自動合成機 (ABI社製のDNA synthe

sizer Model 381 A) にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

10 (2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

20 (7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

30 (1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例11で合成したn-オクチルチオグルコシドフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)(5)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

50 (4) 実施例11で合成した0.2M n-オクチルチオグルコシドフェニルホスホノアミダイトユニットと

0. 4 Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0. 1 Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にn-オクチルチオグルコシドフェニルホスホネート誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のn-オクチルチオグルコシドフェニルホスホネートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:(n-oct-SGlcPh)-T_sG_sG_sG_sA_sG_sC_sC_sA_sT_sA_sG_sC_sG_sA_sG_sG_sCを合成した。

収量; 40.3 OD

λ_{max}; 256.8 nm

λ_{min}; 229.6 nm

[0261]

【実施例13】

1-0-フェニル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

1-0-フェニル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド

(1.14g, 2.00mmol)を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(1.74ml, 10.00mmol)と、N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロクロリド(0.89ml, 4.00mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン)で精製し、目的物の1-0-フェニル-2,3,4-0-トリベンゾイルグルコシド-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト(1.31g, 1.71mmol, 85%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.97-7.80(m, 6H, o-H of benzoyl), 7.51-7.25, 7.18-7.06(m, 14H, m-, p-H of benzoyl, phenyl), 6.00-5.37(m, 4H, H-1, 2, 3, 4), 4.18-4.12, 3.92-3.72(3H, H-5, 6) 3.61-3.50(m, 2H, CH of isopropyl), 2.57-2.42(4H, CH₂ of cyanoethyl), 1.16-1.04(12H, CH₃ of isopropyl)ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 149.67, 149.19ppm

[0262]

【実施例14】

フェニルグルコシドが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(PhGlc)-T_sG_sG_sG_sA_sG_sC_sC_sA_sT_sA_s

G_sC_sG_sA_sG_sG_sC (配列番号: 31)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0%TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

[0263]以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0%TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果、算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例13で合成したフェニルグルコシド誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)(5)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例13で合成した0.2Mフェニルグルコシドホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

【0264】以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にフェニルグルコシド誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のフェニルグルコシドが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (PhGlc)-T₃G₃G₃G₃A₃G₃C₃A₃T₃A₃G₃C₃G₃A₃G₃G₃Cを合成した。

収量: 56.6 OD

λ_{max}: 256.7 nm

λ_{min}: 228.9 nm

【0265】

【実施例15】

1-0-フェニル-2,3,4-0-トリベンゾイルガラクトシド-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

1-0-フェニル-2,3,4-0-トリベンゾイルガラクトシド(1.14g, 2.00mmol)を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(1.74ml, 10.00mmol)と、N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロクロリド(0.89ml, 4.00mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウ

ムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルラムクロマトグラフィー(ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン)で精製し、目的物の1-0-フェニル-2,3,4-0-トリベンゾイルガラクトシド-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト(1.37g, 1.79mmol, 90%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.12-7.80(m, 6H, o-H of benzoyl), 7.50-7.05(m, 14H, m-, p-H of benzoyl, phenyl), 6.03-5.98, 5.79-5.60, 5.43-5.29(m, 4H, H-1, 2, 3, 4), 4.36-4.12(3H, H-5, 6) 3.60-3.47(m, 2H, CH of isopropyl), 2.75-2.52(4H, CH₂ of cyanoethyl), 1.30-1.06(12H, CH₃ of isopropyl)ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 149.98, 149.60ppm

【0266】

【実施例16】

フェニルガラクトシドが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(PhGal)-T₃G₃G₃G₃A₃G₃C₃A₃T₃A₃G₃C₃G₃A₃G₃G₃C(配列番号: 31)の合成
N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0267】以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた

後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例15で合成したフェニルガラクトシド誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)(5)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例15で合成した0.2Mn-フェニルガラクトシドホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

【0268】以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にフェニルガラクトシド誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のフェニルグルコシドが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (PhGal)-(T₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅C)を合成した。

収量; 61.5 OD

λ_{max}; 257.1 nm

λ_{min}; 229.4 nm

【0269】

【実施例17】

1,3,4-0-トリベンゾイル,2-N-ベンゾイルガラクトサミン-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

1,3,4-0-トリベンゾイル,2-N-ベンゾイルガラクトサミン(1.05g, 1.76mmol)を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(1.53ml, 8.79mmol)と、N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロクロリド(0.78ml, 3.52mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン)で精製し、目的物の1,3,4-0-トリベンゾイル,2-N-ベンゾイルガラクトサミン-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト(0.97g, 1.22mmol, 70%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.50(s, 1H, -NH), 8.22-7.95(m, 8H, o-H of benzoyl), 7.82-7.35(m, 12H, m-, p-H of benzoyl), 6.61-6.56, 6.32-6.18(4H, H-1, 2, 3, 4), 4.32-3.91, 3.87-3.64(m, 3H, H-5, 6), 3.45-3.22(m, 2H, CH of isopropyl), 2.73-2.45(m, 4H, CH₂ of cyanoethyl), 1.39-1.02(m, 12H, CH₃ of isopropyl)ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 149.84, 150.09, 150.43ppm [0270]

【実施例18】

N-ベンゾイルガラクトサミンホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (N-BzGalPO)-(T₅G₅G₅A₅G₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅C) (配列番号: 31)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

141

(5) 0.5 Mテトラエチルチウラムジスルフィド／アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25 M無水酢酸／1-メチルイミダゾール／ルチジン／テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0271】以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2 Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4 Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例17で合成したN-ベンゾイルガラクトサミン誘導体を結合させるためには、同様に0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および

(4) (5)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例17で合成した0.2 MN-ベンゾイルガラクトサミンアミダイトユニットと0.4 Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1 Mヨウ素／水／ピリジン／THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

【0272】以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にN-ベンゾイルガラクトサミン誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア／ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目

142

的物のN-ベンゾイルガラクトサミンホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (N-BzGalPO)-T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅Cを合成した。

収量; 51.6 OD

λ_{max}; 256.2 nm

λ_{min}; 228.9 nm

【0273】

【実施例19】

10 1,3,4-0-トリアセチル,2-N-アセチルガラクトサミン-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

1,3,4-0-トリアセチル,2-N-アセチルガラクトサミン(0.38 g, 1.09 mmol)を無水ピリジン2 ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2 ml x 3回、無水塩化メチレン2 ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5 mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(0.87 ml, 5.00 mmol)と、N,N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロクロリド(0.45 ml, 2.00 mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50 mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50 mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン)で精製し、目的物の1,3,4-0-トリアセチル,2-N-アセチルガラクトサミン-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト(0.40 g, 0.75 mmol, 69%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.50(s, 1H, -NH), 6.20, 5.70-5.56, 5.32(m, 4H, H-1, 2, 3, 4), 4.22-4.10(m, 3H, H-5, 6), 3.90-3.77, 3.61-3.47(m, 12H, CH₃ of acetyl), 2.80-2.50(m, 4H, CH₂ of cyanoethyl), 1.30-1.11(m, 12H, CH₃ of isopropyl)ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 149.50, 149.57, 150.81ppm

【0274】

【実施例20】

40 N-アセチルガラクトサミンホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(N-AcGal)-T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅C(配列番号: 31)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを50 0.2 Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解

してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2M グアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5M テトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0275】以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2M グアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例19で合成したN-アセチルガラクトサミン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)(5)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例19で合成した0.2MN-アセチルガラクトサミンアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1M ヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

【0276】以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にN-アセチルガラクトサミン誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のN-アセチルガラクトサミンホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:(N-AcGal)-TsGsGsGsAsGsCsCsAsTsAsGsCsGsAsGsGsCを合成した。

収量; 9.1 OD

λ_{max}; 257.4 nm

λ_{min}; 229.6 nm

【0277】

20 【実施例21】

1,3,4-0-トリアセチル,2-N-アセチルグルコサミン-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

1,3,4-0-トリアセチル,2-N-アセチルグルコサミン(0.82g, 1.39mmol)を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(1.21ml, 6.95mmol)と、N,N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロクロリド(0.62ml, 2.78mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン)で精製し、目的物の1,3,4-0-トリアセチル,2-N-アセチルグルコサミン-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト(0.47g, 0.59mmol, 42%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.38(s, 1H, -NH), 6.15-5.99, 5.80-5.52(m, 4H, H-1, 2, 3, 4), 4.28-4.08(m, 3H, H-5, 6), 3.96-3.57(m, 12H, CH₃ of acetyl), 2.78-2.53(m, 4H, CH₂ of cyanoethyl), 1.41-1.08(m, 12H, CH₃ of isopropyl) ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 149.76, 150.72ppm

【0278】

【実施例22】

50 N-アセチルグルコサミンホスフェートが結合したホス

ホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(N-AcGu1)-T₃G₃G₃G₃A₃G₃C₃C₃A₃T₃A₃G₃C₃G₃A₃G₃G₃C (配列番号: 31) の合成
N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2M グアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5M テトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2M グアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例21で合成したN-アセチルグルコサミン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)(5)については下記の通りにする以外は上

記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例21で合成した0.2MN-アセチルグルコサミンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

10 以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にN-アセチルグルコサミン誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のN-アセチルグルコサミンホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (N-AcGu1)-T₃G₃G₃G₃A₃G₃C₃C₃A₃T₃A₃G₃C₃G₃A₃G₃G₃Cを合成した。

収量: 42.5 OD

λ_{max}: 257.3 nm

λ_{min}: 229.6 nm

[0279]

【実施例23】

30 1,3,4-0-トリベンゾイル,2-N-トリフルオロアセチルガラクトサミン-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

1,3,4-0-トリベンゾイル,2-N-トリフルオロアセチルガラクトサミン(0.58g, 0.99mmol)を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(0.87ml, 5.00mmol)と、N,N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホクロリド(0.45ml, 2.00mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン)で精製し、目的物の1,3,4-0-トリベンゾイル,2-N-トリフルオロアセチルガラクトサミン-6-0-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト(0.42g, 0.53mmol, 53%)を得た。

147

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.70(s, 1H, -NH), 8.18-7.79 (m, 6H, o-H of benzoyl), 7.66-7.21(m, m-, p-H of benzoyl), 6.66-6.15(m, 4H, H-1, 2, 3, 4), 4.04-3.70(m, 3H, H-5, 6), 3.61-3.42(m, 2H, CH of cyanoethyl), 2.68-2.41(m, 4H, CH₂ of cyanoethyl), 1.31-0.92(m, 12H, CH₃ of cyanoethyl)ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 148.96, 149.38, 150.10ppm
【0280】

【実施例24】

ガラクトサミンホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(G a l N) - T₃ G₃ G₃ G₃ A₃ G₃ C₃ C₃ A₃ T₃ A₃ G₃ C₃ G₃ A₃ G₃ G₃ C (配列番号: 31) の合成

N-4 アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0281】以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

148

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例23で合成したガラクトサミン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)(5)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例23で合成した0.2Mガラクトサミンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

【0282】以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にガラクトサミン誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のガラクトサミンホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (G a l N) - T₃ G₃ G₃ G₃ A₃ G₃ C₃ C₃ A₃ T₃ A₃ G₃ C₃ G₃ A₃ G₃ G₃ Cを合成した。

収量; 38.7 OD

λ_{max}; 256.4 nm

λ_{min}; 229.3 nm

【0283】

【実施例25】

1,3,4-トリベンゾイル,2-N-トリフルオロアセチルグルコサミン-6-O-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

1,3,4-トリベンゾイル,2-N-トリフルオロアセチルグルコサミン(0.82g, 1.39mmol)を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(1.21ml, 6.95mmol)と、N,N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロクロリド(0.62ml, 2.78

mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン）で精製し、目的物の1,3,4-トリベンゾイル,2-N-トリフルオロアセチルグルコサミン-6-O-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト(0.47g, 0.59mmol, 42%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.74(s, 1H, -NH), 8.19-7.81(m, 6H, o-H of benzoyl), 7.62-7.26(m, m, p-H of benzoyl), 6.63-6.32(m, 4H, H-1, 2, 3, 4), 4.22-3.84(m, 3H, H-5, 6), 3.58-3.42(m, 2H, CH of cyanoethyl), 2.70-2.56(m, 4H, CH₂ of cyanoethyl), 1.26-1.07(m, 12H, CH₃ of cyanoethyl)ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 150.33, 150.77, 151.39ppm [0284]

【実施例26】

グルコサミンホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(G u l N) - T₃ G₃ G₃ G₃ A₃ G₃ C₃ C₃ A₃ T₃ A₃ G₃ C₃ G₃ A₃ G₃ G₃ C (配列番号: 31) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

[0285] 以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオ

エート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例25で合成したグルコサミン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)(5)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例25で合成した0.2Mグルコサミンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

[0286] 以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にグルコサミン誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRLPRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のグルコサミンホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (G u l N) - T₃ G₃ G₃ G₃ A₃ G₃ C₃ C₃ A₃ T₃ A₃ G₃ C₃ G₃ A₃ G₃ G₃ Cを合成した。

収量: 33.4 OD

λ_{max}: 257.3 nm

λ_{min}: 229.4 nm

[0287]

【実施例27】

ヘプタベンゾイルメリピオース-N,N-ジイソプロピルア

ミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

ヘプタベンゾイルメリビオース (1.07 g, 1.00 mmol) を無水ピリジン 2 ml x 3 回共沸脱水をした後、無水トルエン 2 ml x 3 回、無水塩化メチレン 2 ml x 3 回共沸をおこなう。その後塩化メチレン 5 ml に溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン (0.87 ml, 5.00 mmol) と、N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロクロリド (0.45 ml, 2.00 mmol) を加え、室温で 1 時間反応させた後、塩化メチレン 50 ml を加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 50 ml で 3 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/塩化メチレン = 80 : 20, 2% トリエチルアミン) で精製し、目的物のヘプタベンゾイルメリビオース-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト (1.91 g, 1.50 mmol, 75%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.13-8.09, 8.03-7.87, 7.84-7.80 (m, 14H, o-H of benzoyl), 7.56-7.24 (m, 21H, m-, p-H of benzoyl), 5.99-5.80, 5.58-5.41 (m, 8H, H-1, 2, 3, 4, 1', 2', 3', 4'), 4.61-4.40, 3.83-3.41 (m, 6H, H-5, 6), 2.58-2.40 (m, 4H, CH₂ of cyanoethyl), 1.12-0.96 (m, 12H, CH₃ of isopropyl) ppm

³¹P-NMR (CDCl₃) δ 149.45, 149.72 ppm

【0288】

【実施例 28】

メリビオースホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Me1) -T₃G₃G₃G₃A₃G₃C₃C₃A₃T₃A₃G₃C₃G₃A₃G₃G₃C (配列番号: 31) の合成

N-4 アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基を DMTr 基で保護されたシチジン誘導体が 1 グラムあたり 20 マイクロモル導入された CPG 50 ミリグラム (1 マイクロモル) を、自動合成機 (ABI 社製の DNA synthesizer Model 381 A) にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを 0.2 M の濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂ 処理を 60 秒間おこない、5'-DMTr 基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルにより CPG を洗浄する。

(3) アルゴンガスにより CPG を乾燥させる。

(4) 0.2 M グアノシンホスホロアミダイトユニットと 0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を 5 分間おこなう。

(5) 0.5 M テトラエチルウラムジスルフィド/ア

セトニトリルにより硫黄化反応を 15 分間おこなう。

(6) 0.25 M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を 30 秒間反応させることにより未反応の 5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作で CPG 上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に 0.2 M の濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1) および (4) については下記の通りにする以外は上記の操作 (1) から (7) を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂ 処理を 60 秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の 5'-DMTr 基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2 M グアノシンホスホロアミダイトユニットと 0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を 5 分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1) の操作で遊離してきた DMTr を比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は 99% 以上であった。18 量体目のチミジル酸を縮合させた後、5' 末端に実施例 27 で合成したメリビオース誘導体を結合させるためには、同様に 0.2 M の濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1) および (4)

(5) については下記の通りにする以外は上記の操作 (1) から (7) を繰り返しておこなう。(1) 3.0%

% TCA/CH₂Cl₂ 処理を 60 秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の 5'-DMTr 基を除去する。

(4) 実施例 27 で合成した 0.2 M メリビオースアミダイトユニットと 0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を 5 分間おこなう。

(5) 0.1 M ヨウ素/水/ピリジン/THF により酸化反応を 30 秒間おこなう。

【0289】以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの 5' 末端にメリビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRLPRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中の CPG を取り出してから、これをアンモニア/ピリジン (5:1) 溶液で 60℃、6 時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相 HPLC (μ Bondasphere C₁₈) を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のメリビオースホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (Me1) -T₃G₃G₃G₃A₃G₃C₃C₃A₃T₃A₃G₃C₃G₃A₃G₃G₃C を合成した。

収量; 78.0 OD

λ_{\max} ; 256.6 nm

λ_{\min} ; 229.2 nm

【0290】

【実施例29】

ヘプタベンゾイルゲンチオビオース-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

ヘプタベンゾイルゲンチオビオース (1.24g, 1.16mmol) を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン (1.01ml, 5.80mmol) と、N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロクロリド (0.50ml, 2.32mmol) を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/塩化メチレン=80:20, 2%トリエチルアミン) で精製し、目的物のヘプタベンゾイルゲンチオビオース-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト (1.36g, 1.07mmol, 93%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.10-7.92, 7.86-7.71(m, 14H, o-H of benzoyl), 7.52-7.19(m, 21H, m, p-H of benzoyl), 6.01-5.83, 5.57-5.45(m, 8H, H-1, 2, 3, 4, 1', 2', 3', 4'), 4.63-4.46, 3.81-3.43(m, 6H, H-5, 6), 2.55-2.43(m, 4H, CH_2 of cyanoethyl), 1.15-0.94(m, 12H, CH_3 of isopropyl) ppm

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ 150.12, 150.43ppm

【0291】

【実施例30】

ゲンチオビオースホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Gen) - T₅G₅G₅G₅A₅G₅C₅C₅A₅T₅A₅G₅C₅G₅A₅G₅G₅C (配列番号: 31) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム (1マイクロモル) を、自動合成機 (ABI社製のDNA synthesizer Model 381A) にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/ CH_2Cl_2 処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0292】以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/ CH_2Cl_2 処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例29で合成したゲンチオビオース誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)(5)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。(1) 3.0% TCA/ CH_2Cl_2 処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例29で合成した0.2Mゲンチオビオースアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

【0293】以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にゲンチオビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出して

から、これをアンモニア／ピリジン（5：1）溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC（ μ Bondasphere C₁₈）を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のゲンチオピオースホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド：（Gen）-T₃G₃G₃A₃G₃C₃C₃A₃T₃A₃G₃C₃G₃A₃G₃G₃Cを合成した。

収量： 37.9 OD

λ_{\max} ； 256.6 nm

λ_{\min} ； 229.0 nm

【0294】

【実施例31】

オクタベンゾイルイソマルトリオース-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイトの合成

オクタベンゾイルイソマルトリオース（1.56g, 1.00mmol）を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン（0.87ml, 5.00mmol）と、N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロクロリド（0.45ml, 2.00mmol）を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈しこの溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／塩化メチレン＝80：20、2%トリエチルアミン）で精製し、目的物のオクタベンゾイルイソマルトリオース-N,N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト（1.21g, 0.69mmol, 69%）を得た。

³¹P-NMR（CDCl₃） δ 150.92, 151.23ppm

【0295】

【実施例32】

イソマルトリオースホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド：

（Iso）-T₃G₃G₃A₃G₃C₃C₃A₃T₃A₃G₃C₃G₃A₃G₃G₃C（配列番号：31）の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム（1マイクロモル）を、自動合成機（ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A）にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反

カラム中でおこなう。

（1）3.0%TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

（2）アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

（3）アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

（4）0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

（5）0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド／アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

（6）0.25M無水酢酸／1-メチルイミダゾール／ルチジン／テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

（7）アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0296】以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、（1）および（4）については下記の通りにする以外は上記の操作（1）から（7）を繰り返しておこなう。

（1）3.0%TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

（4）0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。（1）の操作で遊離してきたDMTrを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例31で合成したイソマルトリオース誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、（1）および（4）（5）については下記の通りにする以外は上記の操作（1）から（7）を繰り返しておこなう。（1）3.0%TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

（4）実施例31で合成した0.2Mイソマルトリオースアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

（5）0.1Mヨウ素／水／ピリジン／THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

【0297】以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にイソマルトリオース誘導体を

157

導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン (5:1) 溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC (μ Bondasphere C₁₈) を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のイソマルトリオースホスフェートが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (Iso)-T₁G₂G₃G₄A₅G₆C₇C₈A₉T₁₀A₁₁G₁₂C₁₃G₁₄A₁₅G₁₆G₁₇Cを合成した。

収量; 51.8 OD

λ_{\max} ; 256.4 nm

λ_{\min} ; 228.9 nm

【0298】

【実施例33】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

T₁G₂G₃GGAGCCATAGCGAG₁₈G₁₉C (配列番号: 32) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム (1マイクロモル) を、自動合成機 (ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A) にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0299】以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグ

158

アノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P₁x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mアデノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は9%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン (5:1) 溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC (μ Bondasphere C₁₈) を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: T₁G₂G₃GGAGCCATAGCGAG₁₈G₁₉Cを合成した。

収量; 35.4 OD

λ_{\max} ; 256.5 nm

λ_{\min} ; 229.1 nm

【0300】

【実施例34】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオピオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Gen)-T₁G₂G₃GGAGCCATAGCGAG₁₈G₁₉C (配列番号: 32) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム (1マイクロモル) を、自動合成機 (ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A) にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2M グアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1M ヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0301】以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたアデノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のアデノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるためには、グアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2M アデノシンアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にゲンチオビオース誘導体を結合させるためには同様にゲンチオビオースアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジルホスホン酸誘導体の5'-P1x基を除去する。

(4) 0.2M ゲンチオビオースホスホロアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

【0302】以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にゲンチオビオース誘導体を導入することがで

きる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:(Gen)-T₇₅G₇₅GGAGCCATAGCGAG₇₅G₇₅Cを合成した。

収量; 17.0 OD

λ_{max}; 255.6 nm

λ_{min}; 229.8 nm

【0303】

【実施例35】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にメリビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Me1)-T₇₅G₇₅GGAGCCATAGCGAG₇₅G₇₅C(配列番号:32)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2M グアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1M ヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合

161

させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホロアミダイトユニットを0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2 Mアデノシンアミダイトユニットと0.4 Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にメリビオース誘導体を結合させるためには同様にメリビオースアミダイトユニットを0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジルホスホン酸誘導体の5'-P1x基を除去する。

(4) 0.2 Mメリビオースホスホロアミダイトユニットと0.4 Mテトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

【0304】以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にメリビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にメリビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:(Me1)-T₁₈G₁₈GGAGCCATAGCGAG₁₈G₁₈Cを合成した。

収量; 22.5 OD

λ_{max}; 255.2 nm

λ_{min}; 229.6 nm

【0305】

【実施例36】

162

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

T₁₈GGGAGC₁₈C₁₈AT₁₈AGC₁₈GAGGC₁₈T
(配列番号: 33)の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてシチジンフェニルホスホアミダイトユニットを0.2 Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2 Mシチジンフェニルホスホアミダイトユニットと0.4 Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1 Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25 M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたシチジンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるためには、グアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたシチジンフェニルホスホネート誘導体の5'-Mox基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2 Mグアノシンアミダイトユニットと0.4 Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:

163

1) 溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC (μ Bondasphere C₁₈) を用いて精製をおこなう。以上の操作によりピリミジンヌクレオチドにフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: T_r G G G A G C_r C_r A T_r A G C_r G A G G C_r T を合成した。

収量; 44.4 OD

λ_{\max} ; 256.1 nm

λ_{\min} ; 228.2 nm

【0306】

【実施例37】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5' 末端にゲンチオビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Gen) - T_r G G G A G C_r C_r A T_r A G C_r G A G G C_r T (配列番号: 33) の合成

5' - 水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてシチジフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5' - DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mシチジフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5' - 水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたシチジフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるためには、グアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

164

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたシチジフェニルホスホネート誘導体の5' - Mox基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。19量体目のチミジルホスホン酸を縮合させた後、5' 末端にゲンチオビオース誘導体を結合させるためには同様にゲンチオビオースアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジルホスホン酸誘導体の5' - P1x基を除去する。

(4) 0.2Mゲンチオビオースホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

【0307】以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5' 末端にゲンチオビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC (μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のピリミジンヌクレオチドにフェニルホスホネート結合を導入し、5' 末端にゲンチオビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (Gen) - T_r G G G A G C_r C_r A T_r A G C_r G A G G C_r T を合成した。

収量; 32.4 OD

λ_{\max} ; 255.7 nm

λ_{\min} ; 229.2 nm

【0308】

【実施例38】

部分的にメチルホスホネート結合を導入し、5' 末端にゲンチオビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Gen) - T_r G_r G G A G C C A T A G C G A G_r G_r C (配列番号: 34) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5' - 水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マ

イクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシメチルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシメチルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0309】以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシメチルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシメチルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシメチルホスホネート誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mアデノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にゲンチオビオース誘導体を結合させるためには同様にゲンチオビオースアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間お

ない、保護されたチミジルホスホン酸誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 0.2Mゲンチオビオースホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

【0310】以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にゲンチオビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にメチルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (Gen)-T₁G₁GGAGCCATAGCGAG₁G₁Cを合成した。

収量; 65.7 OD

λ_{max}; 256.0 nm

λ_{min}; 229.8 nm

【0311】

【実施例39】

部分的にメチルホスホネート結合を導入し、5'末端にメリビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Me1)-T₁G₁GGAGCCATAGCGAG₁G₁C (配列番号: 34)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシメチルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシメチルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

167

(6) 0.25 M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0312】以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンメチルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンメチルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホロアミダイトユニットを0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンメチルホスホネート誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2 M アデノシンアミダイトユニットと0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にメリビオース誘導体を結合させるためには同様にメリビオースアミダイトユニットを0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、

(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジルホスホン酸誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 0.2 M メリビオースホスホロアミダイトユニットと0.4 M テトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にメリビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にメチルホスホネート結合を導入し、5'末端にメリビオースを結合させたホスフ

168

エートアンチセンスオリゴヌクレオチド:(Me1)-T₁G₁GGAGCCATAGCGAG₁G₁Cを合成した。

収量: 59.3 OD

λ_{max}: 256.9 nm

λ_{min}: 227.8 nm

【0313】

【実施例40】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にN-ベンゾイルガラクトサミンを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(N-BzGal)-T₁G₁GGAGCCATAGCGAG₁G₁C (配列番号: 32)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホアミダイトユニットを0.2 Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-Plx基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2 M グアノシンフェニルホスホアミダイトユニットと0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1 M ヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25 M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホロアミダイトユニットを0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導

体の5'-P i x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2 M アデノシンアミダイトユニットと0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にN-ベンゾイルガラクトサミン誘導体を結合させるためには同様にN-ベンゾイルガラクトサミンアミダイトユニットを0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジルホスホン酸誘導体の5'-P i x基を除去する。

(4) 0.2 M N-ベンゾイルガラクトサミンホスホアミダイトユニットと0.4 M テトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にN-ベンゾイルガラクトサミン誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にN-ベンゾイルガラクトサミンを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:(N-BzGal)-T₁₈GGAGCCATAGCGAG₁₈Cを合成した。

収量; 21.2 OD

λ_{max}; 256.5 nm

λ_{min}; 228.9 nm

[0314]

【実施例41】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

T₁₈GGAGCCATAGCGAGG₁₈C(配列番号: 35)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホアミダイトユ

ニットを0.2 Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

10 (4) 0.2 M グアノシンフェニルホスホアミダイトユニットと0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1 M ヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25 M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

20 以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるためには、グアノシンホスホアミダイトユニットを0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P i x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2 M グアノシンアミダイトユニットと0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端1塩基にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:T₁₈GGAGCCATAGCGAGG₁₈Cを合成した。

収量; 20.9 OD

50 λ_{max}; 256.0 nm

λ_{\min} ; 228.4 nm

【0315】

【実施例42】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Gen)-T_rGGGAGCCATAGCGAGG_rC (配列番号: 35) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるためには、グアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均

収率は99%以上であった。18量体目のチミジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にゲンチオビオース誘導体を結合させるためには同様にゲンチオビオースアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジルホスホン酸誘導体の5'-P1x基を除去する。

(4) 0.2Mゲンチオビオースホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にゲンチオビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μ Bondasphere C18)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端1塩基にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Gen)-T_rGGGAGCCATAGCGAGG_rCを合成した。

収量; 21.1 OD

λ_{\max} ; 256.3 nm

λ_{\min} ; 228.4 nm

【0316】

【実施例43】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にN-ベンゾイルガラクトサミンを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(N-BzGal)-T_rGGGAGCCATAGCGAGG_rC (配列番号: 35) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収

率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるためには、グアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にN-ベンゾイルガラクトサミン誘導体を結合させるためには同様にN-ベンゾイルガラクトサミンアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジルホスホン酸誘導体の5'-P1x基を除去する。

(4) 0.2MN-ベンゾイルガラクトサミンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

【0317】以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にN-ベンゾイルガラクトサミン誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRLPRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60

℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C18)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端1塩基にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にN-ベンゾイルガラクトサミンを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:(N-BzGa1)-T₁₈G₁₈GAGCCATAGCGAGG₁₈Cを合成した。

収量; 25.8 OD

λ_{max}; 256.1 nm

λ_{min}; 228.6 nm

【0318】

【実施例44】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェート逆配列オリゴヌクレオチド:

C₁₈G₁₈GAGCGATACCGAGG₁₈G₁₈T(配列番号:37)の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるためには、グアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)

および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェート逆配列オリゴヌクレオチド: C₇₅G₂₅GAGCGATACCGAGG₇₅G₇₅Tを合成した。

収量; 14.8 OD

λ_{max}; 257.3 nm

λ_{min}; 229.9 nm

【0319】

【実施例45】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオピオースを結合させたホスフェート逆配列オリゴヌクレオチド:

(Gen)-C₇₅G₇₅GAGCGATACCGAGG₇₅G₇₅T (配列番号: 37)の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるためには、グアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のシチジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にゲンチオピオース誘導体を結合させるためには同様にゲンチオピオースアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたシチジルホスホン酸誘導体の5'-Mox基を除去する。

(4) 0.2Mゲンチオピオースホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

【0320】以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にゲンチオピオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェ

ニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオビ
オースを結合させたホスフェート逆配列オリゴヌクレオ
チド：(Gen)-C₁₈G₁₈GAGCGATACCGA
GG₁₈G₁₈Tを合成した。

収量；12.2 OD

λ_{max}；257.2 nm

λ_{min}；230.0 nm

【0321】

【実施例46】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端
にメリビオースを結合させたホスフェートアンチセンス
逆配列オリゴヌクレオチド：

(MeI)-C₁₈G₁₈GAGCGATACCGAGG₁₈
G₁₈T (配列番号：37)の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体
が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG5
0ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(AB
I社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけて
ある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホ
スホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるよう
に無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボト
ルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操
作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこ
ない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収
率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイト
ユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5
分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸
化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/
ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させ
ることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる
乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保
護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合
させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェ
ニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と
同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎ
の塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるため
には、グアノシンホスホノアミダイトユニットを0.2
Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)
および(4)については下記の通りにする以外は上記の
操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこ
ない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導

体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を
算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンアミダイトユニットと0.4
Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次
伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルア
ルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均
収率は99%以上であった。18量体目のシチジルホス
ホン酸を縮合させた後、5'末端にメリビオース誘導体
を結合させるためには同様にメリビオースアミダイトユ
ニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付
けた後、(1)および(4)については下記の通りにす
る以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこ
なう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこ
ない、保護されたシチジルホスホン酸誘導体の5'-M
ox基を除去する。

(4) 0.2Mメリビオースホスホノアミダイトユ
ニットと0.4Mテトラゾールにより縮合反応を5分間お
こなう。

以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にメリ
ビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終
了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synth
esis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL
PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中
のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジ
ン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることによ
り、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基
の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondaspher
e C18)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目
的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結
合を導入し、5'末端にメリビオースを結合させたホス
フェートアンチセンスオリゴヌクレオチド：(MeI)
-C₁₈G₁₈GAGCGATACCGAGG₁₈G₁₈Tを合
成した。

収量；15.3 OD

λ_{max}；257.2 nm

λ_{min}；230.3 nm

【0322】

【実施例47】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェ
ートアンチセンスオリゴヌクレオチド：

T₁₈G₁₈GGAGC₁₈C₁₈AT₁₈AGC₁₈GAG₁₈G₁₈
C (配列番号：39)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDM
Tr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり2
0マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マ
イクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthe
sizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつ
める。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユ

ニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P₁x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mアデノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入し、ピリジン塩基に対してもフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレ

オチド: T₁G₁GGAGC₁C₁AT₁AGC₁GA
G₁G₁Cを合成した。

収量; 43.1 OD

λ_{max}; 257.6 nm

λ_{min}; 229.4 nm

[0323]

【実施例48】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオビオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Gen)-T₁G₁GGAGC₁C₁AT₁AGC₁GA
G₁G₁C (配列番号: 39)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P₁x基を除去する。この溶液は縮合収率を

181

算定するために保存しておく。

(4) 0.2 M アデノシンアミダイトユニットと 0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を 5 分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1) の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は 99% 以上であった。18 量体目のチミジルホスホン酸を縮合させた後、5' 末端にゲンチオピオース誘導体を結合させるためには同様にゲンチオピオースアミダイトユニットを 0.2 M の濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1) および (4) については下記の通りにする以外は上記の操作 (1) から (7) を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂ 処理を 60 秒間おこない、保護されたチミジルホスホン酸誘導体の 5' - P i x 基を除去する。

(4) 0.2 M ゲンチオピオースホスホロアミダイトユニットと 0.4 M テトラゾールにより縮合反応を 5 分間おこなう。

【0324】以上の操作によりオリゴヌクレオチドの 5' 末端にゲンチオピオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中の CPG を取り出してから、これをアンモニア/ピリジン (5:1) 溶液で 60℃、6 時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相 HPLC (μ Bondasphere C₁₈) を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の 5'、3' 末端 2 塩基にフェニルホスホネート結合を導入し、5' 末端にゲンチオピオースを結合させたホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド、(Gen) - T p G p G G A G C p C p A T p A G C p G A G p G p C を合成した。

収量; 43.3 OD

λ_{max}; 257.9 nm

λ_{min}; 229.5 nm

【0325】

【実施例 49】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

C₁₈ G₁₈ G A G C₁₈ G A T₁₈ A C₁₈ C₁₈ G A G G₁₈ G₁₈ T (配列番号: 40) の合成

5' - 水酸基を DMT r 基で保護されたチミジン誘導体が 1 グラムあたり 20 マイクロモル導入された CPG 50 ミリグラム (1 マイクロモル) を、自動合成機 (ABI 社製の DNA synthesizer Model 381 A) にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを 0.2 M の濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボト

182

ルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂ 処理を 60 秒間おこない、5' - DMT r 基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルにより CPG を洗浄する。

(3) アルゴンガスにより CPG を乾燥させる。

(4) 0.2 M グアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと 0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を 5 分間おこなう。

(5) 0.1 M ヨウ素/水/ピリジン/THF により酸化反応を 30 秒間おこなう。

(6) 0.25 M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を 30 秒間反応させることにより未反応の 5' - 水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作で CPG 上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のグアノシンホスフェートを結合させるためには、グアノシンホスホロアミダイトユニットを 0.2 M の濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1) および (4) については下記の通りにする以外は上記の操作 (1) から (7) を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂ 処理を 60 秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の 5' - P i x 基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2 M グアノシンアミダイトユニットと 0.4 M テトラゾールにより、縮合反応を 5 分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1) の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は 99% 以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中の CPG を取り出してから、これをアンモニア/ピリジン (5:1) 溶液で 60℃、6 時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相 HPLC (μ Bondasphere C₁₈) を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の 5'、3' 末端 2 塩基にフェニルホスホネート結合を導入し、ピリジン塩基に対してもフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: C₁₈ G₁₈ G A G C₁₈ G A T₁₈ A C₁₈ C₁₈ G A G G₁₈ G₁₈ T を合成した。

183

収量; 38.0 OD

 λ_{\max} ; 256.7 nm λ_{\min} ; 229.0 nm

【0326】

【実施例50】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

$C_{75}C_{75}CCCACCACTTCC C_{75}C_{75}T$ (配列番号: 41) の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてシチジフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mシチジフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたシチジフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のシチジフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のシチジホスフェートを結合させるためには、シチジホスホアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたシチジフェニルホスホネート誘導体の5'-Mox基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mシチジアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次

184

伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のシチジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にゲンチオビオース誘導体を結合させるためには同様にゲンチオビオースアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたシチジルホスホン酸誘導体の5'-Mox基を除去する。

(4) 0.2Mゲンチオビオースホスホアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にゲンチオビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: $C_{75}C_{75}CCCACCACTTCC C_{75}C_{75}T$ を合成した。

収量; 37.6 OD

 λ_{\max} ; 256.1 nm λ_{\min} ; 229.1 nm

【0327】

【実施例51】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオビオースを導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Gen)- $C_{75}C_{75}CCCACCACTTCC C_{75}C_{75}T$ (配列番号: 41) の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてシチジフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収

率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2 Mシチジンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4 Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1 Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25 M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたシチジンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のシチジンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のシチジンホスフェートを結合させるためには、シチジンホスホロアミダイトユニットを0.2 Mの濃度

に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたシチジンフェニルホスホネート誘導体の5'-Mox基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2 Mシチジンアミダイトユニットと0.4 Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のシチジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にゲンチオビオース誘導体を結合させるためには同様にゲンチオビオースアミダイトユニットを0.2 Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたシチジルホスホン酸誘導体の5'-Mox基を除去する。

(4) 0.2 Mゲンチオビオースホスホロアミダイトユニットと0.4 Mテトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にゲンチオビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラ

ム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオビオースを導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (Gen)-C₁₈C₁₈CCCCACCACTTCCCT₁₈C₁₈Tを合成した。

収量; 55.7 OD

λ_{max}; 257.9 nm

λ_{min}; 234.5 nm

[0328]

【実施例52】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

C₁₈C₁₈CTGTCCCGGGAATAG₁₈G₁₈T (配列番号: 42)の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2 Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2 Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4 Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1 Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25 M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

[0329] 以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホロアミダイトユ

ニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2M アデノシンアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: C₁₈C₁₈CTGTCCCGGGATAG₁₈G₁₈Tを合成した。

収量; 57.1 OD

λ_{max}; 259.1 nm

λ_{min}; 230.9 nm

【0330】

【実施例53】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオビオースを導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(Gen)-C₁₈C₁₈CTGTCCCGGGATAG₁₈G₁₈T (配列番号: 42)の合成

5'-水酸基をDMTr基で保護されたチミジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2M グアノシンフェニルホスホアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1M ヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M 無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

【0331】以上の操作でCPG上に導入されたチミジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2M アデノシンアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のシチジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にゲンチオビオース誘導体を結合させるためには同様にゲンチオビオースアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたシチジルホスホン酸誘導体の5'-Mox基を除去する。

(4) 0.2M ゲンチオビオースホスホアミダイトユニットと0.4M テトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にゲンチオビオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させること

により、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC (μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入し、5'末端にゲンチオビオースを導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: (G e n) - C₁₈ C₁₈ C T G T C C C G G A T A G₁₈ G₁₈ Tを合成した。

収量; 52.4 OD

λ_{\max} ; 258.4 nm

λ_{\min} ; 230.7 nm

【0332】

【実施例54】

フェニルホスホネートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

T₁₈ G₁₈ G₁₈ G₁₈ A₁₈ G₁₈ C₁₈ C₁₈ A₁₈ T₁₈ A₁₈ G₁₈ C₁₈ G₁₈ A₁₈ G₁₈ G₁₈ C (配列番号: 43) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム (1マイクロモル) を、自動合成機 (ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A) にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99

%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法 ("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン (5:1) 溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC (μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のすべてのインターヌクレオチド結合をフェニルホスホネート結合にしたフェニルホスホネートアンチセンスオリゴヌクレオチド: T₁₈ G₁₈ G₁₈ G₁₈ A₁₈ G₁₈ C₁₈ C₁₈ A₁₈ T₁₈ A₁₈ G₁₈ C₁₈ G₁₈ A₁₈ G₁₈ G₁₈ Cを合成した。

収量; 35.6 OD

λ_{\max} ; 254.7 nm

λ_{\min} ; 227.5 nm

【0333】

【実施例55】

5'末端にゲンチオビオースを結合したフェニルホスホネートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

(G e n) - T₁₈ G₁₈ G₁₈ G₁₈ A₁₈ G₁₈ C₁₈ C₁₈ A₁₈ T₁₈ A₁₈ G₁₈ C₁₈ G₁₈ A₁₈ G₁₈ G₁₈ C (配列番号: 43) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム (1マイクロモル) を、自動合成機 (ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A) にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合

させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。18量体目のチミジルホスホン酸を縮合させた後、5'末端にゲンチオピオース誘導体を結合させるためには同様にゲンチオピオースアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジルホスホン酸誘導体の5'-P₁x基を除去する。

(4) 0.2Mゲンチオピオースホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより縮合反応を5分間おこなう。以上の操作によりオリゴヌクレオチドの5'末端にゲンチオピオース誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のすべてのインターヌクレオチド結合をフェニルホスホネート結合にし、5'末端にゲンチオピオースを導入したフェニルホスホネートアンチセンスオリゴヌクレオチド、(Gen)-T₁G₂G₃G₄A₅G₆C₇A₈T₉A₁₀G₁₁C₁₂G₁₃A₁₄G₁₅Cを合成した。

収量; 23.1 OD

λ_{max}; 253.4 nm

λ_{min}; 226.7 nm

【0334】

【実施例56】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

G₁G₂AGCCATAGCGAG₁G₁C(配列番号: 44)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリ

ルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のアデノシンホスフェートを結合させるためには、アデノシンホスホアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P₁x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mアデノシンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: G₁G₂AGCCATAGCGAG₁G₁Cを合成した。

収量; 38.3 OD

λ_{\max} ; 256.3 nm

λ_{\min} ; 231.9 nm

【0335】

【実施例57】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

$A_{r_1}G_{r_1}CCATAGCG_{r_1}A_{r_1}G$ (配列番号: 45)

の合成

N-2アミノ基をイソブチリル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたグアノシン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてアデノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mアデノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたグアノシン誘導体に保護されたアデノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のシチジンホスフェートを結合させるためには、シチジンホスホアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mシチジンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μ Bondasphere C18)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: $A_{r_1}G_{r_1}CCATAGCG_{r_1}A_{r_1}G$ を合成した。

収量; 34.6 OD

λ_{\max} ; 258.1 nm

λ_{\min} ; 230.4 nm

【0336】

【実施例58】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

$A_{r_1}G_{r_1}CCATA_{r_1}G_{r_1}C$ (配列番号: 46) の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381 A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合

させることができる。つぎの塩基配列のアデノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のチミジンホスフェートを結合させるためには、チミジンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたアデノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mチミジンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: A₁₈G₁₈CCATA₁₈G₁₈Cを合成した。

収量; 33.0OD

λ_{max}; 258.6nm

λ_{min}; 229.8nm

[0337]

【実施例59】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

G₁₈G₁₈TTTTTTTTTTTTTTTGG₁₈G₁₈G(配列番号: 47)の合成

N-2アミノ基をイソブチリル基で5'-水酸基をDMTr基で保護されたグアノシン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンフェニルホスホアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。(1)3.0%TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存

しておく。

(2)アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3)アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4)0.2Mグアノシンフェニルホスホアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5)0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6)0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7)アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたグアノシン誘導体に保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のチミジンホスフェートを結合させるためには、チミジンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1)3.0%TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4)0.2Mチミジンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド: G₁₈G₁₈TTTTTTTTTTTTTTTGG₁₈G₁₈Gを合成した。

収量; 37.0OD

λ_{max}; 263.7nm

λ_{min}; 232.5nm

[0338]

【実施例60】

部分的にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:

$A_{P_1} A_{P_2} T T T T T T T T T T T T A_{P_3} A_{P_4} A$ (配列番号: 48) の合成

N-6アミノ基をベンゾイル基で5'-水酸基をDMTr基で保護されたアデノシン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてアデノシンフェニルホスホノアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mアデノシンフェニルホスホノアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.1Mヨウ素/水/ピリジン/THFにより酸化反応を30秒間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたアデノシン誘導体に保護されたアデノシンフェニルホスホネート誘導体を縮合させることができる。つぎの塩基配列のアデノシンフェニルホスホネート誘導体を結合させるためには、上記と同様の操作を繰り返すことによりおこなう。さらにつぎの塩基配列のチミジンホスフェートを結合させるためには、チミジンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたアデノシンフェニルホスホネート誘導体の5'-P1x基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mチミジンアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。(1)の操作で遊離してきたトリチルアルコールを比色定量した結果算出した各縮合反応の平均収率は99%以上であった。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a prac

tical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).) にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60℃、6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μ Bondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物の5'、3'末端2塩基にフェニルホスホネート結合を導入したホスフェートアンチセンスオリゴヌクレオチド:
 $A_{P_1} A_{P_2} T T T T T T T T T T T T A_{P_3} A_{P_4} A$ を合成した。

収量: 77.5 OD

λ_{max} : 263.6 nm

λ_{min} : 233.8 nm

[0339]

【実施例61】

1, 3-O-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)-2-O-ベンジルグリセロールの合成
 2-O-ベンジルグリセロール(182.2 mg, 1.00 mmol)と1-O-フルオロ-2, 3, 4, 6-O-テトラアセチルガラクトース(770.6 mg, 2.20 mmol)を無水塩化メチレン(5 ml)に溶解し、この溶液にトリフルオロボランエーテラート(BF₃-Et₂O)(425.8 mg, 3.00 mmol)とモレキュラーシーブ(1.0 g)を加える。この反応溶液を室温で3時間攪拌した後、セライトを用いてろ過をおこなう。ろ液に塩化メチレン50 mlを加え希釈し、この溶液を飽和炭化水素ナトリウム水溶液50 mlで3回洗浄した後に溶媒を減圧下除去する。その後反応物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=8:2)で精製し、目的物の1, 3-O-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)-2-O-ベンジルグリセロールを得る。

[0340]

【実施例62】

1, 3-O-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)グリセロールの合成
 1, 3-O-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)-2-O-ベンジルグリセロール(842.8 mg, 1.00 mmol)をメタノール-酢酸エチル(1:1)(10 ml)に溶解し、これに10% Pd(OH)₂(30 mg)を加える。この溶液を室温下、中圧水素添加(3.5 kg/cm²)をおこない10時間反応させる。反応終了後セライトを用いてろ過をおこない、ろ液に塩化メチレン50 mlを加え希釈し、この溶液を飽和炭化水素ナトリウム水溶液50 mlで3回洗浄した後に溶媒を減圧下除去する。その後反応物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=8:2)で精製し、目的物の1, 3-O-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)グリ

セロールを得る。

【0341】

【実施例63】

1, 3-O-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)-2-O-(N, N, ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロアミダイト)グリセロールの合成

1, 3-O-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)グリセロール(752.7mg, 1.00mmol)を無水ピリジン2ml x 3回共沸脱水をした後、無水トルエン2ml x 3回、無水塩化メチレン2ml x 3回共沸をおこなう。その後塩化メチレン5mlに溶解し、この溶液にジイソプロピルエチルアミン(0.87ml, 5.00mmol)と、N, N-ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロクロリド(0.45ml, 2.00mmol)を加え、室温で1時間反応させた後、塩化メチレン50mlを加え希釈し、この溶液を飽和炭化水素ナトリウム水溶液50mlで3回洗浄した後無水硫酸ナトリウムで乾燥する。溶媒を減圧留去した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/塩化メチレン=8:2, 2%トリエチルアミン)で精製し、目的物の1, 3-O-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)-2-O-(N, N, ジイソプロピルアミノ-O-シアノエチルホスホロアミダイト)グリセロールを得る。

【0342】

【実施例64】

1, 3-O-ビスガラクトシルグリセロールが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:
(G₁A₁)₂G₁Y₁C₁-T₁G₁G₁G₁A₁G₁C₁C₁A₁T₁A₁G₁C₁G₁A₁G₁G₁C₁(配列番号: 31)の合成

N-4アミノ基をベンゾイル基で、5'-水酸基をDMTr基で保護されたシチジン誘導体が1グラムあたり20マイクロモル導入されたCPG50ミリグラム(1マイクロモル)を、自動合成機(ABI社製のDNA synthesizer Model 381A)にすえつけてある反応カラムにつめる。そしてグアノシンホスホロアミダイトユニットを0.2Mの濃度になるように無水アセトニトリルに溶解してユニット保存用のボトルにつめて自動合成機にとりつける。それから以下の操作を自動合成機によって反応カラム中でおこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(2) アセトニトリルによりCPGを洗浄する。

(3) アルゴンガスによりCPGを乾燥させる。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

(5) 0.5Mテトラエチルチウラムジスルフィド/アセトニトリルにより硫黄化反応を15分間おこなう。

(6) 0.25M無水酢酸/1-メチルイミダゾール/ルチジン/テトラヒドロフラン溶液を30秒間反応させることにより未反応の5'-水酸基をブロックする。

(7) アセトニトリルによる洗浄、アルゴンガスによる乾燥をおこなう。

以上の操作でCPG上に導入されたシチジン誘導体に保護されたグアノシン誘導体をホスホロチオエート結合によって縮合させることができる。つぎの塩基配列のグアノシン誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたグアノシン誘導体の5'-DMTr基を除去する。この溶液は縮合収率を算定するために保存しておく。

(4) 0.2Mグアノシンホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作を繰り返すことによりヌクレオチド鎖を順次伸ばしていく。18量体目のチミジル酸を縮合させた後、5'末端に実施例63で合成したガラクトシルグリセロール誘導体を結合させるためには、同様に0.2Mの濃度に溶解して自動合成機に取り付けた後、(1)および(4)については下記の通りにする以外は上記の操作(1)から(7)を繰り返しておこなう。

(1) 3.0% TCA/CH₂Cl₂処理を60秒間おこない、保護されたチミジン誘導体の5'-DMTr基を除去する。

(4) 実施例63で合成した0.2Mガラクトシルグリセロールホスホロアミダイトユニットと0.4Mテトラゾールにより、縮合反応を5分間おこなう。

以上の操作により、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端にガラクトシルグリセロール誘導体を導入することができる。合成反応が終了した後の脱保護操作は常法("Oligonucleotide Synthesis; a practical approach", M. J. Gait (ed), IRL PRESS, (1984).)にしたがっておこなう。反応カラム中のCPGを取り出してから、これをアンモニア/ピリジン(5:1)溶液で60°C 6時間反応させることにより、固相担体からのヌクレオチド鎖の切り出しと保護基の除去をおこなう。その後逆相HPLC(μBondasphere C₁₈)を用いて精製をおこなう。以上の操作により目的物のガラクトシドグリセロールが結合したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド:(G₁A₁)₂G₁Y₁C₁-T₁G₁G₁A₁G₁C₁C₁A₁T₁A₁G₁C₁G₁A₁G₁G₁C₁を合成する。

50 【0343】上記の参考例および実施例で製造された糖

201

誘導体およびオリゴヌクレオチド誘導体の一覧表を下記に示す。

〔参考例1〕

Ts Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C (配列番号:31)

〔参考例2〕

Cs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Cs Cs Gs As Gs Gs T (配列番号:36)

〔参考例3〕

(N-BzGalPO)-Cs Gs Gs As Gs Cs Gs As Ts As Cs Cs Gs As Gs Gs T ((N-BzGalPO)-配列番号:36)

〔参考例4〕

Cw Gw GAGCGATACCGAGGw Gw T (配列番号:38)

〔参考例5〕

Tv Gv GGAGCCATAGCGAGw Gv C (配列番号:34)

〔実施例1〕

1, 2, 3, 4-0-テトラアセチルガラクトース-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例2〕

1, 2, 3, 4-0-テトラアセチルマンノース-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例3〕

(GAL)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((GAL)-配列番号:31)

〔実施例4〕

(MAN)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((MAN)-配列番号:31)

〔実施例5〕

1-0-n-オクチル-2, 3, 4-0-トリベンゾイルグルコシド-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例6〕

(n-oct-Glc)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((n-oct-Glc)-配列番号:31) [実施例7]

1-0-n-オクチル-2, 3, 4-0-トリベンゾイルチオグルコシド-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例8〕

(n-oct-SGlc)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((n-oct-SGlc)-配列番号:31)

〔実施例9〕

1-0-n-オクチル-2, 3, 4-0-トリベンゾイルグルコシド-6-0-(N, N-ジイソプロピルアミノ)フェニルホスホロアミダイト

〔実施例10〕

(n-oct-GlcPh)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((n-oct-GlcPh)-配列番号:31)

〔実施例11〕

1-0-n-オクチル-2, 3, 4-0-トリベンゾイルチオグルコシド-6-0-(N, N-ジイソプロピルアミノ)フェニルホスホロアミダイト [実施例12]

(n-oct-SGlcPh)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C

202

((n-oct-SGlcPh)-配列番号:31)

〔実施例13〕

1-0-フェニル-2, 3, 4-0-トリベンゾイルグルコシド-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例14〕

(PhGlc)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((PhGlc)-配列番号:31)

〔実施例15〕

10 1-0-フェニル-2, 3, 4-0-トリベンゾイルガラクトシド-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例16〕

(PhGal)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((PhGal)-配列番号:31)

〔実施例17〕

1, 3, 4-0-トリベンゾイル, 2-N-ベンゾイルガラクトサミン-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

20 [実施例18]

(N-BzGalPO)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((N-BzGalPO)-配列番号:31)

〔実施例19〕

1, 3, 4-0-トリアセチル, 2-N-アセチルガラクトサミン-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例20〕

(N-AcGal)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((N-AcGal)-配列番号:31)

30 [実施例21]

1, 3, 4-0-トリアセチル, 2-N-アセチルグルコサミン-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例22〕

(N-AcGul)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((N-AcGul)-配列番号:31)

〔実施例23〕

1, 3, 4-0-トリベンゾイル, 2-N-トリフルオロアセチルガラクトサミン-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例24〕

(GalN)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((GalN)-配列番号:31)

〔実施例25〕

1, 3, 4-0-トリベンゾイル, 2-N-トリフルオロアセチルグルコサミン-6-0-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例26〕

(GuIN)-Ts Gs Gs Gs As Gs Cs As Ts As Gs Cs Gs As Gs C ((GuIN)-配列番号:31)

50

〔実施例27〕

ヘプタベンゾイルメリビオース-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例28〕

(Me1)-Ts Gs Gs Gs Gs Gs Cs Cs As Ts As Gs Cs Gs Gs C((Me1)-配列番号:31)

〔実施例29〕

ヘプタベンゾイルゲンチオビオース-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例30〕

(Gen)-Ts Gs Gs Gs Gs Gs Cs Cs As Ts As Gs Cs Gs Gs C((Gen)-配列番号:31)

〔実施例31〕

オクタベンゾイルイソマルトリオース-N, N-ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト

〔実施例32〕

(Iso)-Ts Gs Gs Gs Gs Gs Cs Cs As Ts As Gs Cs Gs Gs C((Iso)-配列番号:31)

〔実施例33〕

Tr G GAGCCATAGCGAGPHG C(配列番号:32)

〔実施例34〕

(Gen)-Tr G GAGCCATAGCGAGPHG C((Gen)-配列番号:32)

〔実施例35〕

(Me1)-Tr G GAGCCATAGCGAG C((Me1)-配列番号:32)

〔実施例36〕

Tr GGGAGC C AT AGC GAGGC T(配列番号:33)

〔実施例37〕

(Gen)-Tr GGGAGC C AT AGC GAGGC T((Gen)-配列番号:33)

〔実施例38〕

(Gen)-T G G GAGCCATAGCGAG G C((Gen)-配列番号:34)

〔実施例39〕

(Me1)-T G G GAGCCATAGCGAG G C((Me1)-配列番号:34)

〔実施例40〕

(N-BzGal)-Tr G GAGCCATAGCGAG C((N-BzGal)-配列番号:32)

〔実施例41〕

Tr GGGAGCCATAGCGAGG C(配列番号:35)

〔実施例42〕

(Gen)-Tr GGGAGCCATAGCGAGG C((Gen)-配列番号:35)

〔実施例43〕

(N-BzGal)-Tr GGGAGCCATAGCGAGG C((N-BzGal)-配列番号:35)

〔実施例44〕

Cr G GAGCGATACCGAGG G T(配列番号:37)

〔実施例45〕

(Gen)-Cr G GAGCGATACCGAGG G T((Gen)-配列番号:37)

〔実施例46〕

(Me1)-Cr G GAGCGATACCGAGG G T((Me1)-配列番号:37)

〔実施例47〕

Tr G GGAGC C AT AGC GAG G C(配列番号:39)

〔実施例48〕

(Gen)-Tr G GGAGC C AT AGC GAG G C((Gen)-配列番号:39)

〔実施例49〕

Cr G GAGC C AT AC C GAGG G T(配列番号:40)〔実施例50〕

Cr C CCCACCACTTCCC C T(配列番号:41)

〔実施例51〕

(Gen)-Cr C CCCACCACTTCCC C T((Gen)-配列番号:41)

〔実施例52〕

Cr C CTGTCCCGGATAG G T(配列番号:42)

〔実施例53〕

(Gen)-Cr C CTGTCCCGGATAG G T((Gen)-配列番号:42)

〔実施例54〕

Tr G G G G A G C C A T A G G G G G A G G G C(配列番号:43)

〔実施例55〕

(Gen)-Tr G G G G A G C C A T A G G G G G A G G G C((Gen)-配列番号:43)

〔実施例56〕

G G G AGCCATAGCGAG G C(配列番号:44)

〔実施例57〕

A G CCATAGCG A G(配列番号:45)

〔実施例58〕

A G CCATA G C(配列番号:46)

〔実施例59〕

G G TTTTTTTTTTTT G G(配列番号:47)

〔実施例60〕

A A TTTTTTTTTTTT A A A(配列番号:48)

〔実施例61〕

1, 3-0-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)-2-0-ベンジルグリセロール

〔実施例62〕

1, 3-0-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)グリセロール

〔実施例63〕

1, 3-0-ビス(2, 3, 4, 6-テトラアセチルガラクトシル)-2-0-(N, N, ジイソプロピルアミノ-0-シアノエチルホスホロアミダイト)グリセロール

〔実施例64〕

((Gal)₂Glyc)-Ts Gs Gs Gs Gs Cs Cs As Ts As Gs Cs Gs Gs C((Gal)₂Glyc)-配列番号:31)

【0344】

【試験例1】細胞接着タンパク質ICAM-1 (Inter cellular Adhesion Molecule 1) 発現遺伝子のプレmRNAの翻訳開始部位付近に対する本発明のホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドをカチオン性リポフェクチン(DOTMA)で包括した誘導体と、同様にDOTMAで包括した相同の塩基配列を有する未修飾ホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび対応するリバース型塩基配列オリゴヌクレオチドのICAM-1発現阻害活性を測定した。ICAM-1発現阻害測定は常法にしたがっておこなった。(M. Y. Chiang et al., J. Biol. Chem., 266, 18162 (1991).)

すなわち、A549細胞(ヒト肺ガン由来細胞)を無血清培地(High Glucose D-MEM)で3回洗浄後、適当量(1.00 μ M, 0.33 μ M)の本発明ホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドとリポフェクチン(DOTMA)10 μ g/mlを含む無血清培地に100 μ l/wellを加え、37℃で4時間培養後同量のアンチセンスを含む10%血清添加培地に置き換え、さら*

ICAM-1阻害活性(DOTMA濃度10 μ g/ml)

*に37℃で4時間培養する。ついでhIL-1 β (最終濃度0.1 ng/ml)あるいはhTNF- α (最終濃度1 ng/ml)添加により、ICAM-1の発現を誘導し、15時間培養した後、ICAM-1 Cell EIAによりICAM-1の発現量の測定をおこない、リポフェクチンで包括した本発明のホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドのICAM-1発現阻害活性を測定する。また、このとき同時にクリスタルバイオレット染色による細胞毒性(cell inhibition)の評価をあわせておこなう。[表1]にICAM-1阻害活性として、リポフェクチンで包括した未修飾ホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドの活性を100とした時のリポフェクチンで包括した本発明のホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドの比較活性(ICAM-1 Relative inhibition (%))とCell inhibition (%)の結果を記す。

【0345】

[表1]

| 誘導体番号 | DNA濃度 (μ M) | ICAM-1 Relative inhibition (%) | Cell inhibition(%) |
|-------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 実施例10 | 1.00 | 104.2 | 12.7 |
| 実施例12 | 0.33 | 108.9 | 12.3 |
| 実施例14 | 0.33 | 122.9 | 15.6 |
| 実施例16 | 1.00 | 106.3 | 14.9 |
| | 0.33 | 140.9 | 15.3 |
| 実施例18 | 0.33 | 112.6 | -5.1 |
| 実施例20 | 1.00 | 112.1 | 9.6 |
| 実施例22 | 1.00 | 123.0 | 20.6 |
| | 0.33 | 158.0 | 13.2 |
| 実施例24 | 1.00 | 104.7 | 8.7 |
| | 0.33 | 162.2 | 7.4 |
| 実施例26 | 1.00 | 106.7 | 10.9 |
| | 0.33 | 146.9 | 1.1 |
| 実施例32 | 1.00 | 102.9 | 41.1 |
| | 0.33 | 108.2 | 26.7 |
| 参考例2 | 1.00 | -8.2 | 13.5 |
| | 0.33 | -0.9 | 19.7 |

【0346】本発明のホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドはいずれも、リポフェクチンで包括した場合に、リポフェクチンで包括した未修飾の同じ塩基配列を有するホスホロチオエートアンチセンス・オリ

ゴヌクレオチドよりも優れたICAM-1発現抑制効果を有することが認められた。実施例16のようなアノメリック性水酸基がフェニル基で置換された化合物を結合させたアンチセンス・オリゴヌクレオチドや実施例1

8、20、22、24および26のような2-アミノ糖の誘導体を導入したアンチセンス・オリゴヌクレオチドでは抑制効果が増強されていることが判明した。なお、これらのアンチセンス・オリゴヌクレオチドの細胞毒性が未修飾のものと比較してほとんど変化がないことと、参考例2の逆配列を持つホスホロチオエートオリゴヌクレオチドにほとんど抑制効果が見られないことより、アンチセンスの5'末端を糖誘導体で修飾したことによってアンチセンス効果が増強されることが明らかになった。

【0347】

【試験例2】細胞接着タンパク質ICAM-1 (Inter cellular Adhesion Molecule 1) 発現遺伝子のプレmRNAの翻訳開始部位付近に対する本発明のホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドと、同様に未修飾ホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドおよび対応するリバース型塩基配列オリゴヌクレオチドのICAM-1発現阻害活性を測定した。ICAM-1発現阻害測定は常法にしたがっておこなった。(M. Y. Chiang et al., J. Biol. Chem., 266, 18162 (1991).)

すなわち、A549細胞(ヒト肺ガン由来細胞)を無*

ICAM-1阻害活性

| 誘導体番号 | DNA濃度 (μ M) | ICAM-1 inhibition (%) | Cell inhibition (%) |
|-------|---------------------|--------------------------|------------------------|
| 実施例18 | 30.0 | 33.5 | 4.9 |
| 参考例1 | 30.0 | -5.1 | 5.5 |
| 参考例3 | 30.0 | -9.6 | 5.9 |

【0349】未修飾のホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、リボフェクチンで包括しない場合にはほとんどICAM-1発現抑制効果を示さない。しかし、本発明の実施例18で製造されたN-ベンゾイルガラクトサミンを結合させたホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドには顕著なICAM-1発現抑制効果が認められた。なお、このアンチセンスの細胞毒性が未修飾のものと比較してほとんど変化がないことと、参考例3の逆配列を持つN-ベンゾイルガラクトサミンが結合したホスホロチオエートオリゴヌクレオチドにほとんど発現抑制効果が見られないことより、アンチセンスの5'末端をN-ベンゾイルガラクトサミンで修飾したことにより、アンチセンス効果が増強されることが明らかになった。

【0350】

【試験例3】細胞接着タンパク質ICAM-1 (Inter cellular Adhesion Molecule 1) 発現遺伝子のプレmRNAの翻訳開始部位付近に対する、本発明の部分的にホスホネート結合を持つホスフェートアンチセンス・オリゴヌクレオチドと、相同の塩基配列を有する未修飾ホスホ

*血清培地(High Glucose D-MEM)で3回洗浄後、適量(20.0 μ M, 30.0 μ M)の本発明のホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドを含む無血清培地に100 μ l/wellを加え、37℃で4時間培養後同量のアンチセンスを含む10%血清添加培地に置き換え、さらに37℃で4時間培養する。ついでhIL1- β (最終濃度0.1 ng/ml)あるいはhTNF- α (最終濃度1 ng/ml)添加により、ICAM-1の発現を誘導し、15時間培養した後、ICAM-1 Cell ELISAによりICAM-1の発現量の測定をおこない、本発明のホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドのICAM-1発現阻害活性を測定する。また、このとき同時にクリスタルバイオレット染色による細胞毒性(cell inhibition)の評価をあわせておこなう。〔表2〕にリボフェクチンで包括しない場合の本発明のホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドのICAM-1発現阻害活性(ICAM-1 inhibition (%))とCell inhibition (%)の結果を記す。

【0348】

〔表2〕

ロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドおよび対応するリバース型塩基配列オリゴヌクレオチドのICAM-1発現阻害活性を測定した。ICAM-1発現阻害測定は常法にしたがっておこなった。(M. Y. Chiang et al., J. Biol. Chem., 266, 18162 (1991).) すなわち、A549細胞(ヒト肺ガン由来細胞)を無血清培地(High Glucose D-MEM)で3回洗浄後、30.0 μ Mの本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを含む無血清培地に100 μ l/wellを加え、37℃で4時間培養後同量のアンチセンスを含む10%血清添加培地に置き換え、さらに37℃で4時間培養する。ついでhIL1- β (最終濃度0.1 ng/ml)あるいはhTNF- α (最終濃度1 ng/ml)添加により、ICAM-1の発現を誘導し、15時間培養した後、ICAM-1 Cell ELISAによりICAM-1の発現量の測定をおこない、本発明の部分的にホスホネート結合を持つホスフェートアンチセンス・オリゴヌクレオチドのICAM-1発現抑制活性を測定する。また、このとき同時にクリスタルバイオレット染色による細胞毒性(cell inhibition)の評価をあわせておこなう。〔表4〕にリボフェク

チンで包括しない場合の、本発明アンチセンス・オリゴ
ヌクレオチドのICAM-1発現阻害活性(ICAM-1 inhi
bition (%))とCell inhibition (%)の結果を記す。 *

ICAM-1 阻害活性

| 誘導体番号 | DNA濃度 (μ M) | ICAM-1 inhibition(%) | Cell inhibition(%) |
|-------|---------------------|-------------------------|-----------------------|
| 実施例33 | 30.0 | 36.3 | 0.1 |
| 実施例34 | 30.0 | 57.1 | 9.9 |
| 実施例35 | 30.0 | 39.2 | 3.3 |
| 実施例44 | 30.0 | 43.5 | 4.3 |
| 実施例45 | 30.0 | 48.5 | 3.5 |
| 実施例46 | 30.0 | 41.3 | 3.6 |
| 実施例54 | 30.0 | 24.3 | 17.3 |
| 実施例55 | 30.0 | 21.1 | 10.8 |
| 実施例56 | 30.0 | 18.1 | -1.4 |
| 実施例59 | 30.0 | 26.2 | -20.7 |
| 参考例1 | 30.0 | 8.8 | 9.3 |

【0352】未修飾のホスホロチオエートアンチセンス・オリゴヌクレオチドはリポフェクチンで包括しない場合にはほとんどICAM-1発現抑制効果を示さない。しかし、本発明の実施例33～35、44～46、54、55、56および59で製造された、部分的にフェニルホスホネート結合を持つホスフェートアンチセンスには顕著なICAM-1発現抑制効果が認められた。このとき細胞毒性はほとんど観察されないことから、部分的に導入されたフェニルホスホネート結合がICAM-1発現に対して抑制効果を有する原因となっていることは明らかである。

【0353】

【発明の効果】本発明のオリゴヌクレオチド誘導体(I)またはその塩は、各種疾病を引き起こす遺伝子のDNAあるいはmRNAに対する相補性によって、
(1) 腫瘍細胞中の腫瘍遺伝子の発現を阻害する、
(2) ウイルスに由来しているウイルス遺伝子の発現を抑制する、
(3) 炎症を引き起こす原因となる遺伝子産物の発現を抑制する、
(4) 悪性腫瘍の化学療法の際の問題となる薬剤耐性遺伝子の発現を制御することができ

配列

TGGGAGCCAT AGCGAGGC

る、(5) PTCA (Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty; 経皮的冠動脈内腔拡張術) 後の血管再狭窄に関わる細胞増殖因子の産生を阻害するので、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、耐性遺伝子などの特定遺伝子の発現を制御する薬剤として用いることができる。更に本発明のオリゴヌクレオチド誘導体(I)またはその塩はターゲットであるDNAもしくはmRNAに、通常のDNA断片に比べ非常に効率よく結合するため、プローブとして効率よく用いることができる。これらはまた薬剤スクリーニングに用いることができる。

【0354】

【配列表】

【0355】

【配列番号：1】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

211

212

【0356】
 【配列番号：2】
 配列の長さ：19
 配列の型：核酸

18
 *鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 *

配列
 TGGGAGCCAT AGCGAGGCT

【0357】
 【配列番号：3】
 配列の長さ：30
 配列の型：核酸

19
 ※鎖の数：一本鎖
 10 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 ※

配列
 GGCTGCTGGG AGCCATAGC GAGGCTGAGGT

【0358】
 【配列番号：4】
 配列の長さ：29
 配列の型：核酸

30
 ★鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 ★

配列
 GGCTGCTGGG AGCCATAGCG AGGCTGAGG

【0359】
 【配列番号：5】
 配列の長さ：28
 配列の型：核酸

29
 ☆鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 ☆

配列
 GGCTGCTGGG AGCCATAGCG AGGCTGAG

【0360】
 【配列番号：6】
 配列の長さ：27
 配列の型：核酸

28
 ◆鎖の数：一本鎖
 30 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 ◆

配列
 GGCTGCTGGG AGCCATAGCG AGGCTGA

【0361】
 【配列番号：7】 配列の長さ：26
 配列の型：核酸

27
 *鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 * 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列
 GGCTGCTGGG AGCCATAGCG AGGCTG

【0362】
 【配列番号：8】
 配列の長さ：25
 配列の型：核酸

26
 ※鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 ※

配列
 GGCTGCTGGG AGCCATAGCG AGGCT

【0363】
 【配列番号：9】
 配列の長さ：24

25
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 50 トポロジー：直鎖状

| | | |
|----------------------------|---------------------|-----|
| 213 | | 214 |
| 配列の種類：他の核酸 合成DNA | | |
| 配列 | | |
| GGCTGCTGGG AGCCATAGCG AGGC | | 24 |
| 【0364】 | * 鎖の数：一本鎖 | |
| 【配列番号：10】 | トポロジー：直鎖状 | |
| 配列の長さ：23 | 配列の種類：他の核酸 合成DNA | |
| 配列の型：核酸 | * | |
| 配列 | | |
| GGCTGCTGGG AGCCATAGCG AGG | | 23 |
| 【0365】 | ※鎖の数：一本鎖 | |
| 【配列番号：11】 | トポロジー：直鎖状 | |
| 配列の長さ：22 | 配列の種類：他の核酸 合成DNA | |
| 配列の型：核酸 | ※ | |
| 配列 | | |
| GGCTGCTGGG AGCCATAGCG AG | | 22 |
| 【0366】 | ★鎖の数：一本鎖 | |
| 【配列番号：12】 | トポロジー：直鎖状 | |
| 配列の長さ：21 | 20 配列の種類：他の核酸 合成DNA | |
| 配列の型：核酸 | ★ | |
| 配列 | | |
| GGCTGCTGGG AGCCATAGCG A | | 21 |
| 【0367】 | ☆鎖の数：一本鎖 | |
| 【配列番号：13】 | トポロジー：直鎖状 | |
| 配列の長さ：20 | 配列の種類：他の核酸 合成DNA | |
| 配列の型：核酸 | ☆ | |
| 配列 | | |
| GGCTGCTGGG AGCCATAGCG | | 20 |
| 【0368】 | ◆鎖の数：一本鎖 | |
| 【配列番号：14】 | トポロジー：直鎖状 | |
| 配列の長さ：19 | 配列の種類：他の核酸 合成DNA | |
| 配列の型：核酸 | ◆ | |
| 配列 | | |
| GGCTGCTGGG AGCCATAGC | | 19 |
| 【0369】 | *鎖の数：一本鎖 | |
| 【配列番号：15】 | トポロジー：直鎖状 | |
| 配列の長さ：18 | 40 配列の種類：他の核酸 合成DNA | |
| 配列の型：核酸 | * | |
| 配列 | | |
| GGCTGCTGGG AGCCATAG | | 18 |
| 【0370】 | 鎖の数：一本鎖 | |
| 【配列番号：16】 | トポロジー：直鎖状 | |
| 配列の長さ：17 | 配列の種類：他の核酸 合成DNA | |
| 配列の型：核酸 | | |
| 配列 | | |
| GGCTGCTGGG AGCCATA | | 17 |

215

216

【0371】
 【配列番号：17】
 配列の長さ：16
 配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA

*

配列

GGCTGCTGGG AGCCAT

16

【0372】
 【配列番号：18】
 配列の長さ：29
 配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

※

配列

GCTGCTGGGA GCCATAGCGA GGCTGAGGT

29

【0373】
 【配列番号：19】
 配列の長さ：28
 配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA

★

配列

CTGCTGGGAG CCATAGCGAG GCTGAGGT

28

【0374】
 【配列番号：20】
 配列の長さ：27
 配列の型：核酸

☆鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA

☆

配列

TGCTGGGAGC CATAGCGAGG CTGAGGT

27

【0375】
 【配列番号：21】
 配列の長さ：26
 配列の型：核酸

◆鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 30 配列の種類：他の核酸 合成DNA

◆

配列

GCTGGGAGCC ATAGCGAGGC TGAGGT

26

【0376】
 【配列番号：22】
 配列の長さ：25
 配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA

*

配列

CTGGGAGCCA TAGCGAGGCT GAGGT

25

【0377】
 【配列番号：23】
 配列の長さ：24
 配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA

※

配列

TGGGAGCCAT AGCGAGGCTG AGGT

24

【0378】
 【配列番号：24】
 配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

50 トポロジー：直鎖状

217

218

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGAGCCATA GCGAGGCTGA GGT

23

【0379】

【配列番号：25】

配列の長さ：22

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

*

配列

GGAGCCATAG CGAGGCTGAG GT

22

【0380】

【配列番号：26】

配列の長さ：21

配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

※

配列

GAGCCATAGC GAGGCTGAGG T

21

【0381】

【配列番号：27】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

20 配列の種類：他の核酸 合成DNA

★

配列

AGCCATAGCG AGGCTGAGGT

20

【0382】

【配列番号：28】

配列の長さ：19

配列の型：核酸

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

☆

配列

GCCATAGCGA GGCTGAGGT

19

【0383】

【配列番号：29】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

◆

配列

CCATAGCGAG GCTGAGGT

18

【0384】

【配列番号：30】

配列の長さ：17

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：他の核酸 合成DNA

*

配列

CATAGCGAGG CTGAGGT

17

【0385】

【配列番号：31】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

NNNNNNNNNN NNNNNNNC

18

219

220

【0386】

【配列番号：32】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

*

配列

NNGGAGCCAT AGCGANNC

18

【0387】

【配列番号：33】

配列の長さ：18

※配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※10 トポロジー：直鎖状配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

NGGGAGNNAN AGNGAGGNT

19

【0388】

【配列番号：34】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

★

配列

NNGGAGCCAT AGCGANNC

18

【0389】

【配列番号：35】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

20☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

☆

配列

NGGGAGCCAT AGCGAGNC

18

【0390】

【配列番号：36】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

◆30

配列

NNNNNNNNN NNNNNNT

18

【0391】

【配列番号：37】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

*

配列

NNGAGCGATA CCGAGNNT

18

【0392】

【配列番号：38】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

40※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

※

配列

NNGAGCGATA CCGAGNNT

18

【0393】

【配列番号：39】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

50

221

222

配列

NNGGAGNNAN AGNGANNC

18

【0394】

【配列番号：40】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

*

配列

NNGAGNGANA NNGAGNNT

18

【0395】

【配列番号：41】

配列の長さ：17

配列の型：核酸

10※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

※

配列

NNCCCACCAC TTCCNNT

17

【0396】

【配列番号：42】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

★20

配列

NNCTGTCCCG GGATANNT

18

【0397】

【配列番号：43】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

☆

配列

NNNNNNNNNN NNNNNNNC

18

【0398】

【配列番号：44】

配列の長さ：16

配列の型：核酸

30◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

◆

配列

NNAGCCATAG CGANNC

16

【0399】

【配列番号：45】

配列の長さ：12

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

*40

配列

NNCCATAGCN NG

12

【0400】

【配列番号：46】

配列の長さ：9

配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

※

配列

NNCCATNNC

9

【0401】

50 【配列番号：47】

223

224

配列の長さ：18
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

*トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成DNA

*

配列

NNTTTTTTTT TTTTNNNG

18

【0402】

※鎖の数：一本鎖

【配列番号：48】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：18

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

※10

配列

NNTTTTTTTT TTTTNNNA

18

【0403】

★鎖の数：一本鎖

【配列番号：49】配列の長さ：17

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCCCACCAC TTCCCT

17

【0404】

☆鎖の数：一本鎖

【配列番号：50】

20 トポロジー：直鎖状

配列の長さ：18

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

☆

配列

CCCTGTCCCG GGATAGGT

18

【0405】

◆鎖の数：一本鎖

【配列番号：51】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：16

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

◆

配列

GGAGCCATAG CGAGGC

16

【0406】

*鎖の数：一本鎖

【配列番号：52】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：12

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

*

配列

AGCCATAGCG AG

12

【0407】

※鎖の数：一本鎖

【配列番号：53】

40 トポロジー：直鎖状

配列の長さ：9

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

※

配列

AGCCATAGC

9

【0408】

鎖の数：一本鎖

【配列番号：54】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：18

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

配列

(114)

特開平7-112997

225

226

GGTTTTTTTT TTTTGGG

18

【0409】

鎖の数：一本鎖

【配列番号：55】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：18

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

配列

AATTTTTTTT TTTTAAA

18

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 H 21/00

(72)発明者 岩佐 進

京都府綴喜郡田辺町大住ヶ丘1丁目21番地
の2